UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra farmaceutické botaniky a ekologie

RIGORÓZNÍ PRÁCE

Biologická aktivita makromycet – D

Biological activity of macromycetes – D

Vedoucí práce: Ing. Kateřina Macáková, Ph.D.

Hradec Králové 2017 Mgr. Lenka Pásztó

Poděkování:

Děkuji Ing. Kateřině Macákové Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, připomínky a pomoc při tvorbě této rigorózní práce. Dále děkuji pracovníkům Katedry botaniky a ekologie za možnost využít přístrojové vybavení laboratoří. Tato práce vznikla v rámci projektu Specifického školského výzkumu SVV/2011/263002.

Prohlášení:

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Rovněž prohlašuji, že jsem tuto rigorózní práci vypracovala samostatně s použitím literatury uvedené v seznamu literatury, ze které jsem čerpala. Tato práce nebyla použita k získání jiného či stejného titulu.

V Olomouci Mgr. Lenka Pásztó

Seznam zkratek

ABTS - 2,2´-azinobis (3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina)
AChE - acetylcholinesterasa
AMK – aminokyseliny
AN – Alzheimerova nemoc
AO – antioxidanty
BuChE – butyrylcholinesterasa
DNA – deoxyribonukleová kyselina
DTNB - 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina
CNS – centrální nervový systém
F-C činidlo – Folin-Ciocalteu činidlo
GSH-Px – glutathionperoxidasa
HEB – hematoencefalická bariéra
MDA – malonaldehyd
RNS – reaktivní formy dusíku
ROS – reaktivní formy kyslíku
SIA – sekvenční injekční analýza
SOD – superoxiddismutasa
T-AOC - celková antioxidační kapacita
TLC – tenkovrstvá chromatografie
VR – volné radikály
VMK – vyšší mastné kyseliny

Obsah

1. Úvod 7
2. Cíl práce 10
3. Teoretická část 11
3.1. Charakteristika řádu Agaricales a jeho vybraných čeledí 11
3.1.1. Systematické zařazení sledovaných taxonů (podle [5]) 12
3.1.2. Morfologická charakteristika a výskyt jednotlivých taxonů 13
3.2. Chemické složení mycelia plodnic 22
3.2.1. Primární metabolity 23
3.2.2. Vitamíny 25
3.2.3. Minerální látky 26
3.2.4. Sekundární metabolity 26
3.2.5. Houbové toxiny a jedy 31
3.2.6. Známé toxické metabolity a otravy u rodů/čeledí sledovaných hub 32
3.2.7. Příklady biologické aktivity sledovaných rodů hub 33
3.3. Antioxidační aktivita 35
3.3.1. Volné radikály (VR) 35
3.3.2. Reaktivní formy kyslíku a dusíku 35
3.3.3. Ochrana lidského těla před volnými radikály 36
3.3.4. Rovnováha mezi antioxidanty a volnými radikály 36
3.3.5. Onemocnění způsobená přítomností volných radikálů 37
3.4. Alzheimerova choroba 38
3.4.1. Epidemiologie 38
3.4.2. Mikroskopické a patogenetické změny 38
3.4.3. Terapie Alzheimerovy nemoci 40
4. Experimentální část a výsledky 43
4.1. Potřeby 43
4.1.1. Rozpouštědla a chemikálie 43
4.1.2. Přístrojové vybavení 43
4.1.3. Detekční činidlo 44
4.1.4. Vyvíjecí soustavy pro tenkovrstvou chromatografii 44
4.1.5. Chromatografický adsorbent 44
4.1.6. Testované druhy hub 44
4.2. Metody 45
4.2.1. Postup přípravy houbových extraktů 45
4.3. Stanovení antioxidační aktivity ABTS testem s využitím SIA 45
4.3.1. Sekvenční injekční analýza (SIA) 46
4.3.2. Princip metody SIA 47
4.3.3. Přístrojová technika SIA 48
4.3.4. Postup práce 48
4.4. Stanovení celkového množství fenolických látek 49
4.4.1. Postup 49
4.5. Důkaz přítomnosti alkaloidů pomocí TLC 50
4.5.1. Faktické údaje 50
4.6. Stanovení inhibice AChE a BuChE 51

4.6.1. Materiál 51
4.6.2. Přístrojové vybavení 51
4.6.3. Příprava lidských erytrocytárních pouzder a plazmy 52
4.6.4. Postup 52
5. Výsledky 54
5.1. Vyhodnocení antioxidační aktivity houbových extraktů 54
5.2. Výsledky stanovení celkového obsahu fenolických látek 55
5.3. Vyhodnocení reakcí pro detekci na alkaloidy 56
5.4. Výsledky stanovení inhibiční aktivity houbových extraktů vůči erytrocytární AChE a sérové BuChE 57
6. Diskuze 58
7. Závěr 61
8. Literatura 62
9. Abstrakt 71
10. Abstract 72

1. Úvod

Houby (Fungi) tvoří samostatnou říši a lze je definovat jako eukaryotní, stélkaté, jedno a mnohobuněčné organismy [1]. Představují skupinu s velkou druhovou rozmanitostí. V jejich počtu se dostupná literatura různí, některé zdroje (např. [2]) uvádějí kolem 100 000 různých druhů, jiné až 300 000 [1]. Obecně lze houby rozdělit na makromycety (houby vytvářející plodnice) a mikromycety, jež jsou vláknité (plísně) nebo jednobuněčné (kvasinky).

Makromycety mají plodnice větší jak 1 mm a ve většině případů se rozmnožují pohlavně, zatímco většina mikromycet se rozmnožuje se v tzv. imperfektní formě (asexuální fáze životního cyklu) [3].

Systematicky se říše hub rozděluje na 4 oddělení, a to Myxomycota, Chytridyomycota, Oomycota a Eumycota [4].

Tato práce je zaměřena na testování hub z oddělení (Eumycota) – vlastní houby – které jsou dle [5] rozděleny na 4 různá pododdělení – Zygomycotina – houby spájivé, Ascomycotina – houby vřeckovýtrusné, Basidiomycotina – houby stopkovýtrusné a tzv. nedokonalé houby Deuteromycotina rozmnožující se pouze nepohlavně.

Houby se zařazují mezi heterotrofní organismy. Na rozdíl od zelených rostlin nejsou schopny fotosyntetické asimilace (neobsahují chlorofyl), a proto přijímají organické látky z těl jiných organismů. Podle toho z jakých zdrojů živiny přijímají, se houby dělí na saprofytické, symbiotické a parazitické ([1], [6]).

Houbové metabolické pochody se více podobají metabolickým pochodům živočichů než rostlin [5]. U rostlin je hlavní zásobní látkou škrob, transportními látkami glukasa, sacharosa a fruktosa. Zatímco u hub jsou hlavními zásobními látkami glykogen a tuky, transportními látkami cukerné alkoholy (mannitol a arabitol), z disacharidů se jedná o trehalosy. Hlavní složkou buněčné stěny hub je chitin, který se vykytuje v živočišné říši, v rostlinné však chybí. Stejně tak je tomu s buněčným lysozymem, který obvykle není v rostlinách obsažen ([7], [8]).

Důležitým znakem hub, jímž se odlišují od ostatních organismů, je syntéza aminokyseliny lysinu. Zatímco jiné organismy syntetizují tuto aminokyselinu přes kyselinu diaminopimelinovou, většina hub ji syntetizuje přes kyselinu α-

aminoadipovou (výjimku tvoří Oomycota) ([7], [8]). Tyto rozdílné metabolické cesty v syntéze lysinu dávají za předpoklad, že se houby od ostatních eukaryotních organismů oddělily v časném stádiu evoluce [1].

Význam hub pro člověka

Pro člověka představují makromycety nejen zdroj potravy, ale také mohou ovlivňovat jeho zdraví, v pozitivním i negativním slova smyslu. Mikromycety jsou pro své metabolické pochody široce využívány v potravinářském průmyslu. Mikroskopické vláknité houby mohou být příčinou mykotických onemocnění, mohou být producenty pro lidský organismus toxických, potencionálně kancerogenních mykotoxinů. Na druhou stranu sehrály významnou úlohu v rozvoji antibakteriální léčby objevem penicilinu, jenž byl izolován z druhu *Penicillinum notatum*. Tento objev stál za významným rozmachem farmaceutického průmyslu [7].

Kromě antibakteriálního účinku byly u některých druhů hub zjištěny účinky antivirové, antimykotické a antiparazitické. Některé dokonce zabraňují vzniku a nárůstu tumorů, alergiím, zánětlivým procesům, sklerotickým pochodům v cévách, dále podporují schopnost snižovat hladinu krevního cukru, chrání jaterní buňky před poškozením nebo posilují imunitní systém [9]. Řada těchto příznivých účinků těsně souvisí s antioxidační aktivitou (schopností vychytávat volné radikály) sekundárních metabolitů (chemické substance obsažené v tělech hub) některých druhů.

Volné radikály se podílí na rozvoji nemocí, jako je infarkt myokardu, revmatoidní artritida, diabetes, ateroskleróza, nádorová onemocnění, onemocnění trávicího traktu, onemocnění ledvin, či neurodegenerativní onemocnění, jakými jsou Parkinsonova a Alzheimerova choroba aj. ([10], [11]). Snahou vědců je nalezení nových látek vykazujících antioxidační aktivitu, které by přispěly ke zpomalení rozvoje těchto onemocnění. Konkrétně u Alzheimerovy choroby jsou antioxidanty využívány jako podpůrná léčba. U tohoto neurodegenarativního onemocnění jsou v terapii běžně využívána léčiva ze skupiny inhibitorů cholinesteras (galantamin, rivastigmin, donepezil). Jedná se o látky s jednoznačně ověřenou účinností. S inhibicí cholinesteras úzce souvisel výběr jednotlivých druhů hub zkoumaných v této práci. Jedná se o druhy příbuzné rodu Cortinarius, u něhož byla již v minulosti zjištěna inhibiční aktivita vůči cholinesterasám. Je možno tedy (alespoň hypoteticky)

předpokládat, že by příbuzné druhy rodu Cortinarius mohly obsahovat látky s inhibiční aktivitou cholinesteras. S inhibiční aktivitou vůči cholinesterasám je spojována přítomnost alkaloidů.

Alkaloidy mohou také stát za jedovatostí některých druhů hub. Co se týče jedů kloboukatých hub, k nejnebezpečnějším patří otravy amatoxiny, falotoxiny a síru obsahujícími cyklickými oligopeptidy s indolovým jádrem. Některé houby jsou jedovaté v syrovém stavu, ale dostatečnou tepelnou úpravou se toxické látky eliminují. I jedlé houby se mohou stát toxickými, jsou-li zkažené, zapařené, nebo začínají-li hnít ([3], [4]).

2. Cíl práce

Cílem této rigorózní práce je kvantifikovat antioxidační aktivitu vodně-ethanolových extraktů hub pomocí testu založeného na redukci (odbarvení) $ABTS^{\cdot+}$ radikálu antioxidantem s využitím sekvenční injekční analýzy (SIA).

Následně je cílem stanovení celkového množství fenolických látek v houbových extraktech s využitím Folin-Ciocalteu činidla. Účelem tohoto měření bylo zjistit, zda existuje vztah mezi množstvím fenolických látek a antioxidační aktivitou houbových extraktů.

Dalším z cílů je zjištění přítomnosti alkaloidů v extraktech hub pomocí tenkovrstvé chromatografie a kvantifikovat inhibiční aktivitu vodně-ethanolových houbových extraktů vůči erytrocytární AChE a sérové BuChE s využitím Ellmanovy spektrofotometrické metody.

3. Teoretická část

Sledované druhy hub se systematicky zařazují do řádu Agaricales (lupenotvaré), které patří do podtřídy Hymenomycetidae, třídy Homobasidiomycetes, pododdělení Basidiomycotina. Pododdělení Basidiomycotina (stopkovýtrusé houby) jsou zařazeny do oddělení Eumycota – vlastní houby [5].

3.1. Charakteristika řádu Agaricales a jeho vybraných čeledí

Řád Agaricales má plodnice pevně masité nebo šťavnaté, většinou rozlišené v klobouk a třeň, jenž může být redukován, takže přisedá plodnice přímo k substrátu. Hymenofor je lupenitý, vzácně chybí nebo je nepravidelný. Při členění na čeledi a rody je významným znakem barva výtrusného prachu. Plodnice bývá v mládí zahalena obalem (velem), který zanechává na jejím povrchu různé zbytky (útržky na klobouku, vlákna nebo šupiny na třeni, pochvu naspodu třeně apod.). Většinou se jedná o saprofyty na rostlinných zbytcích, slabé parazity nebo mykorhizní houby. Lupenaté houby se dělí do 11 čeledí ([5], [6]). Předmětem zájmu této práce jsou druhy hub, jenž patří do čeledi Tricholomataceae (čirůvkovité), Bolbitiaceae (slzečníkovité) a Cortinariaceae (pavučincovité).

Tricholomataceae je jedna z největších čeledí lupenatých hub. Zahrnuje druhy různých velikostí, s velem nebo bez něho, s dužninou masitou až vláknitou, s centrálním nebo postranním třeněm, s lupeny k třeni přirostlými až dlouze sbíhavými. Výtrusný prach je bílý nebo nažloutlý, ojediněle nafialovělý nebo růžový. Výtrusy jsou amyloidní, zřídka cyanofilní, hladké nebo ornamentové. Většina druhů jsou saprofyté, rozkládající odumřelé dřevo nebo listový odpad ([6], [12]).

Bolbitiaceae jsou drobnější a často tence masité houby s centrálním třeněm. Lupeny jsou tenké, vysoké, k třeni přirostlé, trama lupenů je pravidelná, výtrusný prach rezavě hnědý, rezavě okrový až tmavě hnědý. Výtrusy jsou hladké. Pokožka klobouku je složená z okrouhlých až hruškovitých buněk, často jsou vyvinuté cheilocystidy charakteristického tvaru [6].

Čeleď Cortinariaceae se nejvíce podobá čirůvkovitým a jsou také druhou nejpočetnější čeledí lupenatých hub. Společným znakem pavučinovitých je zbarvení výtrusného prachu, který mívá nejrůznější odstíny hnědé nebo rezavé, jen výjimečně

je bílý. Výtrusy jsou často ornamentované, bradavčité, většinou bez viditelného klíčního póru, pokožka klobouku je složena z radiálně uspořádaných hyf, trama lupenů je regulární. Plachetka je vyvinuta nebo chybí, závoj bývá obvykle přítomen v podobě kortiny. Často jsou vyvinuty cystidy. Druhy této čeledi rostou často na dřevu, humusu, v mechu [6].

3.1.1. Systematické zařazení sledovaných taxonů (podle [5])

Říše: Fungi (houby)
Oddělení: Eumycota (vlastní houby)
Pododdělení: Basidiomycotina (houby stopkovýtrusé)
Třída: Homobasidiomycetes
Podtřída: Hymenomycetidae (houby rouškaté)
Řád: Agaricales (lupenotvaré)
Čeleď: Tricholomateceae (čirůvkovité)
Druh: *Mycena epipterygia* (Scop) Fr. (helmovka slizká)
Mycena galericulata (Scop) Fr. (helmovka tuhonohá)
Mycena pura (Pers.:Fr.) (helmovka ředkvičkovitá)
Mycena rosea (Bull.) (helmovka růžová)
Mycena tintinnabulum (Fr.) Quél. (helmovka pařezová)
Čeleď: Bolbiticiaceae (slzečníkovité)
Druh: *Agrocybe molesta* (Lasch) Sing. (polnička tuhá)
Agrocybe praecox (Pers.:Fr.) (polnička raná)
Čeleď: Cortinariaceae (pavučincovité)
Druh: *Dermocybe cinnamomeobadia* (R.Hry.) Mos. (kožnatka rumělková)
Dermocybe semisanguinea (R.Hry.) Mos. (kožnatka polokrvavá)
*Gymnopilus sapineus (*Fr.) R.Maire (šupinovka jedlová)
Inocybe erubescens Blytt (vláknice začervenalá)
Inocybe fastigiata (Schaeff.:Ex.Fr.) Quél. (vláknice kuželovitá)
Inocybe fraudans (Britz.) Sacc. (vláknice voňavá)
Inocybe geophylla (Fr.:Fr.) Kummer (vláknice zemní)
Rozites caperata (Pers.:Ex.Fr.) P. Karst.(sluka svraskalá)

3.1.2. Morfologická charakteristika a výskyt jednotlivých taxonů

Rod: Mycena (helmovka)

Druh: *Mycena epipterygia* (Scop.:Fr.) S.F.Gray. (helmovka slizká) (Obr. 1)

Obr. 1: *Mycena epipterygia* (Scop.:Fr.) S.F.Gray. (autor [13]).

Klobouk má v průměru 1-2,5 cm. Tvar klobouku je zvoncovitý, se sloupnutelnou, rosolovitou pokožkou. Povrch klobouku je hladký, matný, za vlhka lesklý. Barvou olivově žlutý až olivově hnědý s bělavým okrajem. Lupeny obloukovitě přirostlé, krátce sbíhavé, bílé až bělavě žluté. Křehký třeň je zprvu celý citronově žlutý, později nahoře bílý a dole žlutý. Je tak lepkavý, že bývá často pokryt kousky rostlin. Dužnina rezavějící, moučné vůně. Barva výtrusného prachu je bílá. Výtrusy amyloidní, bezbarvé, válcovité. Roste ve vlhčích lesích v jehličí a listí nebo na travnatých místech, často ve velkém počtu ([3], [6], [14]).

Druh: *Mycena galericulata* (Scop.:Fr.) Quél. (helmovka tuhonohá) (Obr. 2)

Obr. 2: *Mycena galericulata* (Scop.:Fr.) Quél. (autor [13]).

Klobouk je v průměru 2-5 cm široký, bělavé, šedé nebo hnědavé barvy. Tvar klobouku je zvoncovitý, kuželovitý, často s nízkým tupým hrbolem, pak rozložený, mnohdy vrásčitý až rýhovaný, pružný, suchý. Lupeny jsou široké, řídké, zoubkem sbíhavé, bílé barvy, ve stáří často až narůžovělé, u klobouku žebernaté. Třeň dlouhý, pružný, dutý, světle šedohnědý, dole bíle vlásenitý, jinak lysý a hladký. Dužnina tuhá, bělavé barvy, bez zápachu, okurkově moučné chuti. Výtrusný prach houby je bílý. Jednotlivé výtrusy mají elipsoidní tvar, jsou bezbarvé, amyloidní. Roste jednotlivě nebo v menších trsech na pařezech, padlých kmenech a zbytcích tlejícího dřeva listnáčů, zřídka jehličnanů. Klobouky houby jsou jedlé. Roste od května až do prosince ([3], [6], [15]).

Druh: *Mycena pura* (Pers.:Fr.) Kummer (helmovka ředkvičkovitá) (Obr. 3)

Obr. 3: *Mycena pura* (Pers.:Fr.) Kummer (autor [13]).

Klobouk je 2-6 cm široký, vyklenutý, záhy ploše rozložený, tence masitý, za vlhka růžový či nafialovělý, matný. Za sucha světle růžový nebo nafialovělý, s lupeny až do středu prosvítavými. Lupeny jsou přirostlé, růžové. Třeň je tuhý, poměrně tlustý a krátký, dolů často rozšířeny. Barva je světle fialová, dole bíle plstnatá. Dužnina je nafialovělá, silně ředkvičkovité vůně a podobné chuti. Výtrusný prach houby je bílý a výtrusy bezbarvé, elipsoidní. Druh se vyskytuje na spadaném listí a jehličí v lesích listnatých (duby, buky) a jehličnatých (smrky), hájích a na loukách. Nedoporučuje se sbírat pro možnost záměny s jedovatou helmovkou růžovou. Roste v období od května do října ([3], [6], [12]).

Druh: *Mycena rosea* (Bull.) Gramberg (helmovka růžová) (Obr. 4)

Obr. 4: *Mycena rosea* (Bull.) Gramberg (helmovka růžová) (autor Stanislav Jirásek, in [16]).

Klobouk je polokulovitý až kuželovitý nebo zvonovitý, hladký, matný, rýhovaný, sytě růžový nebo oranžovorůžový s tmavým středem a přívěskatým okrajem. Lupeny jsou sbíhavé, růžové. Třeň dutý, hladký, světle hnědý, narůžovělý, naspodu žlutý. Dužnina je bílá. Voní a chutná rovněž po ředkvičkách. Roste hlavně v listnatých lesích, ale můžeme ji najít růst i na spadaném jehličí, zejména pak v půdách bohatých na vápno. Jedná se o jedovatou houbu. Její výskyt lze sledovat od května do října ([3], [6], [17]).

Druh: *Mycena tintinnabulum* (Fr.) Quél. (helmovka pařezová) (Obr. 5)

Obr. 5: *Mycena tintinnabulum* (Fr.) Quél. (autor [13]).

Klobouk bývá polokulovitý, později zvoncovitý až široce kuželovitý, na okrajích hladký mírně lepkavý. Zpočátku béžový, poté šedohnědý až hnědočerný, v mládí někdy i s olivovým nádechem. Lupeny jsou široce připojené až krátce

sbíhavé, bělavé až našedlé barvy, někdy slabě narůžovělé. Třeň je tuhý, bělavý, hnědavý až tmavě šedohnědý. Dužnina má slabou vůni a svíravou až nahořklou chuť. Roste od října do počátku dubna v bohatých trsech na tlejících pařezech a ležících kmenech zejména listnatých stromů, výjimečně jehličnanů ([15], [17]).

Rod: Agrocybe

Druh: *Agrocybe molesta* (Lasch) Sing. (polnička tuhá) (Obr. 6)

Synonymum: *Agrocybe dura* ([3])

Obr. 6: *Agrocybe molesta* (Lasch) Sing. (autor Miroslav Junek, in [16]).

Polnička tuhá má sklenutý až plochý klobouk, matný, rozpukaný, slonovinově až smetanově žlutý, se zbytky véla na okraji. Klobouk je hladký, ale velmi často praská vlivem suchého povětří, vzor prasklin připomíná mozaiku. Lupeny jsou přirostlé, zpočátku světle žlutohnědé, v dospělosti nabývají tmavohnědou barvu. Barva třeně je bělavá až bledě žlutavá s vločkatým prstenem. Zabarvení dužniny je rovněž bělavá. Výtrusy tabákově hnědé. Chuť houby je nahořklá. Houbu můžeme najít na dřevěném odpadu, nebo v trávě při cestách, v parcích a sadech, v listnatých lesích a na loukách. Houba je jedlá. Roste od léta do konce podzimu ([3], [14]).

Druh: *Agrocybe praecox* (Pers.:Fr.) Fayod (polnička raná) (Obr. 7)

Obr. 7: *Agrocybe praecox* (Pers.:Fr.) Fayod (autor [13]).

Houba má sklenutý, matný klobouk, zabarvený do smetanovo-okrova až do bledě okrovo hnědé barvy. Za studena je odstín spíše bělavý. Lupeny jsou přirostlé, bělavé, poté okrově až tmavohnědé. Třeň je válcovitý, na bázi ztlustlý, vláknitý, smetanový až hnědavý s brzy pomíjivým tenkoblanným prstenem. Dužnina bílá až smetanová. Chuť i barva jsou moučné. Vyskytuje se hojně, obvykle ve skupinách na dřevěných odštěpcích v parcích, sadech, zahradách a v trávě. Roste na jaře. Jedná se o jedlou houbu ([3], [18]).

Rod: Cortinarius

Podrod: *Dermocybe*

Druh: *Dermocybe cinnamomeobadia* (R.Hry.) Mos. (kožnatka skořicově hnědá) (Obr. 8)

Synonymum: *Cortinarius croceus* (Schaeff.) Gray (pavučinec šafránový), *Cortinarius sommerfeltii* (Høiland) M.M. Moser (pavučinec Sommerfeltův)

Obr. 8: *Dermocybe cinnamomeobadia* (R.Hry.) Mos. (autor Stanislav Jirásek, in [16]).

Plodnice má zprvu kuželovitý až zvoncovitý klobouk se širokým hrbolem. Barva skořicově až temně červenohnědá, struktura vláknitá. Lupeny v mládí někdy až oranžové se žlutým ostřím. Třeň houby je válcovitý, na vrcholu světle až jasně žlutý, níže žlutavě hnědý, někdy až okrově oranžový s podélnými červeně až oranžově rezavými vlákny vela, na bázi hnědý. Dužnina je žlutavá. Vůně plodnice ředkvičková. Roste ne příliš hojně v podmáčených smrčinách i ve vlhčích mechatých smrkových a smrkoborových lesích [18].

Druh: *Dermocybe semisanguinea* (Fr.) Mos. (kožnatka polokrvavá) (Obr. 9)
Synonymum: *Cortinarius semisanguineus* (Fr.) Gillet (pavučinec polokrvavý)

Obr. 9: *Dermocybe semisanguinea* (Fr.) Mos. (autor [13]).

Klobouk je nízce vyklenutý až ploše rozložený, tupě hrbatý, matný, jemně vláknitý. Barva olivově hnědá až načervenale hnědá. V mládí je klobouk na okraji spojený s třeněm nažloutlým závojem. Lupeny jsou husté, krvavě červené až tmavočervené, prosvítavé. Třeň je zlatožlutý až okrový. Dužnina okrová. Výtrusný prach houby je rezavý. Výtrusy elipsoidně vejčité, velmi jemně bradavčité, rezavě hnědé. Roste ve vlhčích jehličnatých lesích a pod břízami. Vyskytuje se v období od července do října ([3], [6]).

Rod: Gymnopilus

Druh: *Gymnopilus sapineus* (Fr.) R.Maire (plaménka jedlová) (Obr. 10)

Obr. 10: *Gymnopilus sapineus* (Fr.) R.Maire (autor Stanislav Jirásek, in [16]).

Klobouk je asi 3 – 8 cm široký, sklenutý, pak ploše rozložený, hladký, nebo drobně šupinkatý, zlatožlutý nebo žlutooranžový až hnědožlutý. Lupeny jsou zlatožlutě zabarveny. Třeň je hnědý s bílými šupinkami, svrchu žlutý, na bázi bíle plstnatý. Jedná se o nejedlou houbu, její chuť je nahořklá a vůně silně nasládlá. Hojně se vyskytuje na kmenech a silných větvích listnatých stromů, ale také ji lze nalézt na dřevě smrků a borovic. Roste od července do listopadu ([3], [17]).

Rod: Inocybe

Druh: *Inocybe erubescens* A. Blytt (vláknice začervenalá) (Obr. 11)

Synonymum: *Inocybe Patouillardii* (vláknice Patouilardová)

Obr. 11: *Inocybe erubescens* A. Blytt (autor Stanislav Jirásek, in [16]).

Celá plodnice je zprvu bílá, pomačkáním a stářím cihlově nebo rumělkově červená. Klobouk 3-8 cm široký, zpočátku kuželovitý, později zvoncovitý a nakonec plochý, paprsčitě vláknitě rozpukaný, hedvábitě lesklý. Lupeny má bledé,

pak našedlé, někdy červeně skvrnité, zoubkem přirostlé, mírně husté. Stejně jako pokožka klobouku se po pomačkání zbarvuje do červena také bělavá dužnina. Dužnina voní po ovoci. Výtrusný prach houby je hnědý. Válcovitý, vláknitý třeň je zpočátku bělavý, později taktéž růžový až červená. Vláknice začervenalá je hojným druhem vyskytující se v listnatých lesích, ale také v parcích a zahradách zejména na vápnitých půdách. Roste od května do července. Jedná se o prudce jedovatou houbu ([6], [19]).

Druh: *Inocybe fastigiata* (Schaeff. ex Fr.) Quél. (vláknice kuželovitá)
(Obr. 12)
Synonymum: *Inocybe rimosa* (Bull.) P.Kumm (vláknice rozsedalá)

Obr. 12: *Inocybe fastigiata* (Schaeff. ex Fr.) Quél. (autor Stanislav Jirásek, in [16]).

Šířka klobouku je 3-7 cm, kuželovitý, nebo níže sklenutý s výrazným hrbolkem. Barva klobouku je světle okrově žlutý, žlutohnědý nebo hnědý, paprsčitě vláknitý a rozpukaný. Lupeny jsou husté, olivově žluté pak hnědavé, na ostří bělavé. Třeň válcovitý, bledě hnědožlutý, bílý na vrcholku. Dužnina má bílou barvu, pouze nad lupeny světle žlutou, s nevýrazným pachem a nepříjemnou chutí. Vyskytuje se v listnatých i jehličnatých lesích. Je prudce jedovatá ([3], [6], [20]).

Druh: *Inocybe fraudans* (Britz.) Sacc. (vláknice jablečná) (Obr. 13)

Obr. 13: *Inocybe fraudans* (Britz.) Sacc. (autor [13]).

Klobouk houby je 2-9 cm široký, kuželovitého, zvoncovitého tvaru s hrbolkem. V mládí bíle zabarven, pokrytý velem, později krémový, oranžově hnědý až hnědý. Lupeny jsou bělavé, později žlutošedé až žlutohnědé, s vločkatým bělavým ostřím. Třeň válcovitý, na vrcholu chlupatý, jinde vláknitý, bělavý, od báze světle žlutohnědý až oranžově hnědý, nakonec červenohnědý. Dužnina houby je bělavá, po poranění červená. Vůně je silně ovocná. Vyskytuje se velmi vzácně, jednotlivě nebo ve skupinách, obvykle na vápencových půdách pod buky, duby, lipami, smrky a borovicemi. Roste od poloviny května do října [18].

Druh: *Inocybe geophylla* (Fr.) P.Kumm (vláknice zemní) (Obr. 14)

Obr. 14: *Inocybe geophylla* (Fr.) P.Kumm (autor Václav Hrdina, in [16]).

Klobouk 1-4 cm v průměru, kuželovitý, pak nízce vyklenutý s hrbolem, čistě bílý, později nažloutlý, nebo celý žlutý, jemně paprsčitě vláknitý, na okraji v mládí spojený s třeněm pavučinovým bílým závojem. Lupeny smetanově až hlínově hnědé. Třeň hedvábitý, vláknitý, bílý. Dužnina zabarvena do bíla. Výtrusný prach hnědý.

Výtrusy skoro mandlovité, žlutohnědé. Hojná v listnatých a smíšených lesích, na bohatých půdách. Roste od července do října. Jedná se o jedovatou houbu ([3], [6]).

Rod: Rozites

Druh: *Rozites caperata* (Pers. ex. Fr.) P.Karst (sluka svraskalá) (Obr. 15)

Obr. 15: *Rozites caperata* (Pers. ex. Fr.) P.Karst (autor Stanislav Jirásek, in [16]).

Klobouk je v průměru 4 – 12 cm, v mládí vejčitý nebo polokulovitý, později široce zvoncovitý, ve stáří až plochý, s tupým hrbolem, často vrásčitý. V mládí bělomodravě ojíněný, s okrajem podvinutým, často se zbytky véla, později žlutý až bledě okrově hnědý. Lupeny vysoké, husté, často zvlněné, bledé, později hlínově žluté. Třeň bělavý až zahnědlý, s blanitým botkovitým prstenem ve spodní části třeně. Dužnina je vodnatá, smetanová. Výtrusný prach rezavě hnědý. Výtrusy mandlovité, jemně bradavičnaté, žluté. Roste v jehličnatých lesích, nejhojnější je výskyt v horských smrčinách. Roste pouze na kyselých půdách. Sluka svraskalá je jedlý druh ([3], [6], [20]).

3.2. Chemické složení mycelia plodnic

Voda společně se základními energetickými živinami (bílkoviny, sacharidy, lipidy) jsou nejvíce zastoupenými složkami nejen houbových těl, ale všech biologických materiálů. Tyto látky vznikají syntézou z jednodušších, nízkomolekulárních organických složek. Mimo to je v buňce ještě asi 20 jiných typů nízkomolekulárních sloučenin, které se nepodílejí na výstavbě makromolekul, ale mají katalytický význam v kombinaci s enzymy. Obsah vody v houbách je kolem 90 % a sušina zaujímá zbylých 10 % ([1], [9]). Houby mají nízkou energetickou

hodnotu, díky vysokému obsahu vody a nízkému obsahu tuků (nepředstavují významný zdroj esenciálních nenasycených mastných kyselin ani nežádoucích kyselin mastných).

Vitamíny a minerály jsou v tělech hub zastoupeny v menší míře než uvedené základní živiny. Jejich využitelnost je nižší než ze zeleniny vzhledem k přítomnosti stavebního polysacharidu chitinu, který omezuje stravitelnost jiných látek a sám je při tom nestravitelný (omezuje se tak již vžité tvrzení, že jsou houby bohatým zdrojem bílkovin, stopových prvků a vitamínů). Na druhou stranu je jeho výhodou snížení rizika nežádoucích složek, jako jsou těžké kovy nebo radioaktivní látky [9].

Důležitými obsahovými látkami jsou přímé produkty metabolismu – tzv. sekundární metabolity. Jedná se o chemicky velmi rozmanitou skupinu látek. Sekundární metabolity mají význam jak v toxikologii, tak v oblasti humánní a veterinární medicíny. Zkoumáním zatím neanalyzovaných druhů hub se nabízí možnost získání nové chemické sloučeniny s biologickou aktivitou. Rozhodně se jedná o perspektivní skupinu v rozvoji nových léčiv.

3.2.1. Primární metabolity

Sacharidy

Monosacharidy

Vyskytují se v houbách vzácně (obvykle fosforylované, v dospělých plodnicích je trehalosa hydrolyzována na glukosu) [8].

Oligosacharidy

V houbách se běžně vyskytuje transportní disacharid trehalosa tzv. houbový cukr. Společně s cukernými alkoholy plní důležité biologické funkce jako je udržení osmotického tlaku, schopnost regulovat intracelulární hladinu koenzymů, dále pak při parazitismu na vyšších rostlinách. Trehalosu lze najít jen v mladých plodnicích. K razantnímu poklesu v množství trehalosy (stejně tak cukerného alkoholu mannitolu) dochází povařením houby, zatímco sušení a zmrazení způsobují jen zanedbatelné ztráty ([1], [9], [21]).

Zásobní polysacharidy

Stejně jako u živočichů je u hub zásobním polysacharidem glykogen. Přítomnost glykogenu v houbách nepředstavuje z hlediska lidské výživy mimořádný přínos [9].

Stavební polysacharidy

Základní složkou buněčných stěn hub jsou stavební polysacharidy. K nejpodstatnějším se řadí chitin, chitozan, polygalakturonová kyselina, mannany, galaktany a vzácně celulosa. Hlavním úkolem těchto látek je udržení pevnosti buněčných stěn. Dalšími polysacharidy, které se přirozeně vyskytují v houbových tělech, jsou glukany. Nejčastěji jsou složeny z glukosy ([1], [9], [22]).

Lipidy

Celkový obsah lipidů v houbové sušině je relativně nízký, kolem 2 – 6 %. Lipidy hub můžeme rozdělit na neutrální a polární. Neutrální jsou tvořeny jednoduchými lipidy, především triacylglyceroly, které se vyskytují ve formě kapiček (triglyceridů) nebo krystalků (ergosterolu) rozptýlených ve vakuolách nebo jsou zabudovány do funkčních struktur. Polární lipidy jsou tvořeny složenými lipidy, nejčastěji se jedná o fosfolipidy. Během studie [23] bylo zjištěno, že hlavním fosfolipidem je fosfatidylcholin (lecitin). Neutrální lipidy slouží především jako zásobárna a zdroj energie, zatímco polární lipidy plní funkci stavebních složek. Fosfolipidy jsou důležitou součástí buněčných membrán, umožňující jejich propustnost a elastičnost. Vyšší mastné kyseliny (VMK) v lipidech hub jsou nejčastěji jednosytné, s přímým uhlíkovým řetězcem, se sudým počtem uhlíků a současně je počet uhlíků vyšší jak 10. Řetězec je nasycený nebo obsahuje dvojné vazby. Pro houby je charakteristické cis uspořádání na všech dvojných vazbách. V zastoupení VMK převládají kyselina olejová, linolová a kyselina palmitová. V houbách jsou také přítomny tzv. mykosteroly, z nichž nejrozšířenější je již výše zmíněný ergosterol, jenž v houbách zaujímá 60 – 70 % z celkového množství sterolů. K dalším více zastoupeným látkám ze skupiny mykosterolů se řadí fungisterol a ergosta-7,5-dienol ([1], [9]).

Bílkoviny

Nejen v houbách ale obecně v biologickém materiálu převládají bílkoviny, přítomnost volných aminokyselin (AMK) a peptidů je nízký. Na rozdíl od živočichů jsou rostliny a houby schopny vytvářet všech 20 základních AMK, které buňka tvoří z jednoduchých uhlíkatých a dusíkatých komponent. Působením enzymů transaminas může být dusík AMK použit k syntéze jiných AMK. Uhlíkový zbytek pak může být metabolizován pro získání energie. Část AMK vzniká během energetického metabolismu buňky z meziproduktů degradace glukosy, další část z meziproduktů Krebsova cyklu ([1], [9]).

Enzymy

Jedná se buď o čisté bílkoviny, nebo se skládají z bílkovinného nosiče a nebílkovinné nízkomolekulární organické sloučeniny. Obecně lze říci, že enzymy jsou katalyzátory. U hub jsou výrazné především účinky enzymů, jež se podílí na rozkladu odumřelých organismů. Stávají se tak nezbytným článkem v koloběhu života. Enzymy lze získat z mycelia pěstovaných hub, ale je možné je zkoumat i u hub volně rostoucích ([1], [9]).

Nukleové kyseliny

Jedná se o vysokomolekulární látky, které se složením a strukturou nikterak neliší od nukleových kyselin jiných organismů [1].

3.2.2. Vitamíny

Houby obsahují ve zvýšeném množství vitamíny B_1, B_2, B_3, B_5, B_6, B_9 a někdy také vitamín B_{12}. Dále pak vitamín E a K a vitamín D_2, resp. jeho provitamín (ergosterol). Osvětlené části hub obsahují více vitamínu D_2 než části zastíněné. Jak se ukázalo, intenzita osvětlení je významnější než stáří plodnice. Některé druhy hub obsahují také β-karoten ([9], [22]).

3.2.3. Minerální látky

O zastoupení minerálních látek a jejich množství v tělech hub rozhoduje nejen druh houby, ale také podmínky prostředí (půda, místo rozšíření). Houby obsahují především draslík, fosfor, síru, hořčík, železo, vápník, sodík; ale také mikroelementy jako je měď, zinek, jod, lithium, fluor, chrom, mangan, molybden. Již zmíněný fosfor je součástí polyfosfátových granulí, označovaných také jako volutin. Houby kumulují tento prvek ze substrátu, ve kterém rostou. Fosfor je nedostatkovým prvkem v prostředí a houby vynakládají značnou energii na jeho získání. Za mimořádný lze považovat obsah selenu, kterého může být až 100x více než v zelenině ([8], [22]).

3.2.4. Sekundární metabolity

Jedná se o přímé produkty metabolismu a nijak významně se neúčastní základních metabolických drah. V minulosti byly mylně považovány za odpadní produkty metabolismu. Sekundární metabolity jsou obvykle produkovány až po proběhnutí růstové fáze a jejich tvorba souvisí se snahou přizpůsobovat se životním podmínkám, s rozmnožováním, s ochranou, přežitím. Jak uvádí ve své knize Klán [1] je známo téměř 40 typů sekundárních metabolitů hub a až tisíc sloučenin (vzhledem k roku vydání publikace je aktuální počet známých sloučenin s jistotou vyšší). Při syntéze této rozmanité skupiny látek hraje významnou roli acetylkoenzym A. Výchozími látkami syntézy jsou sacharidy, aromatické aminokyseliny, kyselina mevalonová, kyselina šikimová a mastné kyseliny [1].

Vonné a pachové látky

Stovky různých chemických substancí jsou příčinou těchto charakteristických vlastností − vůně, pachu. Dosud popsané sloučeniny lze obecně rozdělit na těkavé a netěkavé. Netěkavé látky ovlivňují vnímání vůně, pachu v kombinaci s chuťovými vjemy při konzumaci hub. Těkavé látky můžeme zařadit do několika různých skupin (deriváty oktanu a oktenu, nižší terpeny, benzaldehyd, sirné sloučeniny aj.) [9].

Barviva

Barevná pestrost hub je zapříčiněna chemickými látkami – pigmenty. Pigmenty mají nejčastěji povahu chinonů, vzácně se jedná o karotenoidy. Obecně je lze rozlišit na chromoforní (lokalizované v buňce) a chromoparní (vylučovány mimo buňku). Přesný biologický význam pigmentace zatím nebyl plně objasněn. Někteří ji považují za odpadní produkty metabolismu. Ukazuje se však, že některé pigmenty mohou plnit funkci přenašečů vodíku při dýchacích pochodech, chránit před UV zářením nebo dokonce vykazovat antibiotický účinek. Míra zabarvení je ovlivněna stářím plodnice, teplotou, přístupem vzduchu, celkovými podmínkami prostředí a v neposlední řadě je ovlivněna intenzitou světla (houby s výrazně zabarvenou plodnicí rostou na zastíněných místech, zatímco plodnice s barvou nevýraznou, světle hnědou nebo bílou se vyskytují na otevřených stanovištích). Pozornost vzbuzují houby měnící barvu plodnice mechanickým poškozením. Z chemického hlediska se jedná o oxidaci fenolických látek vzdušným kyslíkem ([1], [8], [9]).

Látky izolované či identifikované v testovaných druzích (rodech) hub

Doposud izolované a pro účely této práce zjištěné látky ve zkoumaných druzích (rodech) jsou uvedeny v Tab. 1. V tabulce jsou uvedeny izolované látky jak z druhů testovaných v této práci (tučně zvýrazněny v tabulce), tak i ostatních z příslušných rodů. Autorkou nebyly zjištěny izolované látky z druhů *Agrocybe molesta*, *Dermocybe cinnamomeobadia*, *Gymnopilus sapineus*, *Inocybe fastigiata*, *Inocybe fraudans*, *Inocybe geophylla*, *Mycena epipterygia* a *Mycena rosea*.

Tab. 1: Izolované látky zkoumaných druhů (rodů).

Rod/druh	Indikované látky	Citace
Agrocybe aegerita	galektin (AAL)	[24]
Agrocybe cylindracea	agrocybenin (alkaloid)	[25]
Agrocybe chaxingu	2,6-di-terc-butyl-4-methylfenol, 2-pentylfuran, benzenacetaldehyd, fenylethanol, 2-methylheptan a indol	[26]
Agrocybe praecox	okta-2,4-diynamid (agrocybin A), (*E*)-okta-4-en-2-ynamid (agrocybin B), (*Z*)-okta-6-en-2,4-diynamid (agrocybin C), (*E*)-okta-6-en-2,4-diynamid (agrocybin D), 8-amino-8-oxookta-4,6-diynylacetát (agrocybin E), 2-formyl-3,5-dihydroxybenzylacetát, *o*-orsellinaldehyd	[27]
Agrocybe salicacola	agrocybin A - G	[28]
	agrocybon (seskviterpen se spirodienonovou strukturou)	[29]
Cortinarius sp.	6-methylxanthopurpurin-3-*O*-methylether, fyscion (antrachinon), (1*S*,3*S*)-austrokortilutein (antrachinon), (1*S*,3*R*)-austrokortilutein (antrachinon), (1*S*,3*S*)-austrokortirubin (antrachinon), torosachryson (antrachinon), emodin (antrachinon), erytroglaucin (antrachinon), kortinarin A (alkaloid), kortinarin B (alkaloid), orellanin (alkaloid), orellin (alkaloid), orellinin (alkaloid)	[30], [31]
Cortinarius brunneus	brunnein A (alkaloid)	[32]
Cortinarius hinnuleus	geosmin (bicyklický alkohol), ß-karyofylen (seskviterpen), ß-barbaten (seskviterpen), 1-okten-3-ol, 1-okten-3-on, oktan-3-ol, oktan-3-on, 2-okten-1-ol	[33]
Cortinarius infractus	infraktopikrin (alkaloid)	[34]

Tab. 1: Izolované látky zkoumaných druhů (rodů) *(pokračování)*

Rod/druh	Indikované látky	Citace
Cortinarius tenuipes	kortenuamid A ((4*E*,8*E*)-*N*-D-2'-hydroxytetrakosanoyl-1-*O*-β-D-glukopyranosyl-9-methyl-4,8-sfinga dienin), kortenuamid B ((4*E*,8*E*)-*N*-D-2'-hydroxytrikosanoyl-1-*O*-β-D-glukopyranosyl-9-methyl-4,8-sfingadienin), kortenuamid C ((4*E*,8*E*)-*N*-D-2'-hydroxyl-dokosanoyl-1-*O*-β-D-glukopyranosyl-9-methyl-4,8-sfingadienin)	[35]
Cortinarius umidicola	3-aldehyd-2-amino-6-methoxypyridin, (*R*)-glycidyloktadekanoát	[35]
Cortinarius vibratilis	vibratilicin (3-[3-(dimetylamino)-4-(hydroxyamino)-4-oxobutoxy]-2-(palmitoyloxy)propyl (9*E*,12*E*)-oktadeka-9,12-dienoát)	[35]
Dermocybe sp.	8-*O*-β-D-glukopyranosid, 8-*O*-β-D-genciobiosid, ω,5,2',3',4',6'-hexaacetyl-1-*O*-methylxanthorin-8-*O*-β-D-glukopyranosid, 5, 2',3',4',2",3",4",6"-oktaacetyl-1-*O*-methylxanthorin 8-*O*-β-D-genciobiosid	[36]
	ω-hydroxyxanthorin-1-*O*-methylether, xanthorin-1-*O*-methylether	[37]
	7,7'-bifyscion, emodin (antrachinon), AFDM (anhydroflavomannin-9,10-chinon-6,6'-dimethylether), dermoglaucin (antrachinon), dermocybin (antrachinon), flavomannin-6,6'-dimethylether, endokrocin (antrachinon), 5-chlordermolutein (antrachinon), 5-chlordermorubin (antrachinon), dermolutein (antrachinon), dermorubin (antrachinon), emodin-glukosid (antrachinon), dermoglaucin-glykosid (antrachinon), dermocybin-glukosid (antrachinon), endokrocin-glykosid (antrachinon), dermolutein-glykosid (antrachinon), dermorubin-glykosid (antrachinon)	[38]
	fallacinol (antrachinon)	[39]
	austrokolorin A1 a B1 (antrachinon)	[40]
Dermocybe cardinalis	kardinalin 2 (naftochinonový pigment)	[41]
Dermocybe icterinoides	(P)-(+)-skyrim (antrachinon) ikterinoidin A a B (antrachinon)	[38], [42], [43]

Tab. 1: Izolované látky zkoumaných druhů (rodů) *(pokračování)*

Rod/druh	Indikované látky	Citace
Dermocybe sanguinea	alizarin (1,2-dihydroxy-9,10-antracendion), emodin (1,3,8-trihydroxy-6-methyl-9,10-antracendion), antrachinon (9,10-antracendion)	[44]
Dermocybe (semi)sanguinea	emodin (antrachinon), dermoglaucin (antrachinon), dermocybin (antrachinon), endokrocin (antrachinon), dermolutein (antrachinon), dermorubin (antrachinon)	[45]
Dermocybe splendida	(1*S*,3*S*)-austrokortilutein (antrachinon), (1*S*,3*S*)-austrokortirubin (antrachinon)	[46]
	(1*S*,3*S*)-austrokortirubin, (1*S*,3*S*)-austrokortilutein, austrokortinin (antrachinon), xanthorin (antrachinon), 3-methylxanthopurpurin 6-*O*-methylether	[47]
Gymnopilus sp.	4,6-dekadiyn-1,3,8-triol, ergosta-4,6,8,22-tetraen-3-on, bisnoryangonin (4-hydroxy-6-[(*E*)-2-(4-hydroxyfenyl)ethenyl]pyran-2-on), hispidin (2-[(*E*)-2-(3,4-dihydroxyfenyl)ethenyl]-6-hydroxypyran-4-on)	[48]
Gymnopilus spectabilis	hepta-4,6-diyn-3-ol, 7-chlorhepta-4,6-diyn-3-ol	[49]
	(*E*,*E*)-7,12-dioxooktadeka-8,10-dienová kyselina (ostopanová kyselina), ergosterol	[50]
	(3*S*,8*S*)-(-)-4,6-dekadiyn-1,3,8-triol	[51]
	cerevisterol, 4,6-decadiyn-1,3,8-triol	[52]
	gymnoprenol-D (polyisoprenpolyol)	[53]
Inocybe sp.	3(2-dialkylaminoethyl)indol, 3(2-dialkylaminoethyl)-4-hydroxyindol	[54]
Inocybe aeruginascens	psilocybin (alkaloid), aeruginascin (alkaloid)	[55]
	psilocybin (alkaloid), baeocystin (alkaloid), tryptofan	[56]
	aeruginascin (alkaloid)	[57]
Inocybe macrosperma	7,24(28)-ergostadien-3β-ol	[58]
Inocybe napipes	cholin, muskarin (alkaloid)	[59]
Mycena sp.	favolon B (triterpen)	[60]
	3-chlor-*p*-anisaldehyd, 3,5-dichlor-*p*-anisaldehyd	[61]
	9-hydroxyoudemansin A ((*E*)-β-methoxyakrylát)	[62]

Tab. 1: Izolované látky zkoumaných druhů (rodů) *(pokračování)*

Rod/druh	Indikované látky	Citace
Mycena alcalina	chlorofenoly, bromofenoly	[63]
Mycena aurantiomarginata	mycenaaurin A (polyenový pigment)	[64]
Mycena crocata	strobilurin N (ß-methoxyakrylát)	[65]
Mycena dendrobii	6,9-epoxyergosta-7, 22-dien-3-ol, β-sitosterol	[66]
Mycena galericulata	strobilurin O (ß-methoxyakrylát)	[67]
Mycena galopus	monochlorinát-2,3-dihydro-1-benzoxepin	[68]
Mycena haematopus	haematopodin B (alkaloidní pigment), mycenarubin D (alkaloidní pigment), mycenarubin E (alkaloidní pigment), mycenarubin F (alkaloidní pigment)	[69]
Mycena leaiana	leaianafulven (seskviterpen)	[70]
Mycena pura	parachinonová kyselina, strobilurin D (ß-methoxyakrylát)	[71]
	γ-methylen, γ-ethyliden, γ-propyliden-L-glutamová kyselina	[72]
	L-γ-propylidenglutamová kyselina	[73]
Mycena sanguinolenta	sanguinon A (alkaloidní pigment), sanguinon B (alkaloidní pigment), sanguinolentachinon (alkaloid)	[74]
Mycena viridimarginata	10-hydroxyundeka-2,4,6,8-tetraynamid, 3,4,13-trihydroxytetradeka-5,7,9,11-tetraynová kyselina γ-lakton	[75]
Mycena tintinnabulum	tintinnadiol (diterpen)	[76]
Rozites caperata	protein RC28	[77]
	protein RC183	[78]
	S-2-aminoethyl-L-cystein (analog lysinu)	[79], [80]

3.2.5. Houbové toxiny a jedy

Vláknité houby (mikromycety) ovlivňují lidské zdraví přímo nebo nepřímo cestou mykóz, alergií, a mykotoxikóz. Původně se předpokládalo, že jsou mykotoxiny jakýmsi odpadním produktem životních pochodů při látkové výměně. Dnes se vědci domnívají, že tyto látky vznikají přímo při metabolismu a jsou tvořeny za účelem zničení nebo potlačení konkurenčních druhů. Jedná se o heterogenní skupinu nepolárních nízkomolekulárních sloučenin ([21], [31]).

Houby vytvářející plodnice (makromycety) mohou také produkovat toxické metabolity. Otravy, které způsobují, jsou obvykle následkem záměny sbírané houby. Tyto látky nejsou označovány jako mykotoxiny, ale jako houbové jedy [31].

Jak uvádí [20], obecně lze jedovatých druhů hub najít více v listnatých než v jehličnatých lesích a více v jehličnatých než na travnatých plochách mimo les. Za nejnebezpečnější jsou považovány houby s bílými lupeny na spodní straně klobouku a rostoucí na zemi [20].

Jedy hub makromycet

Obecně lze rozlišit 8 základních typů houbových jedů: amatoxiny/falotoxiny, orelanin, muscimol/ibotenová kyselina, monomethylhydrazin, muskarin, koprin, psilocybin a gastrointestinální iritanty [31].

3.2.6. Známé toxické metabolity a otravy u rodů/čeledí sledovaných hub

Předmětem zájmu této práce jsou houby z čeledi Cortinariaceae (pavučincovité), do nichž mj. patří rod Cortinarius (pavučinec). Kromě cyklického peptidu kortinarinu patří mezi hlavní toxiny látka orellanin (bipyridin-N-oxid), vyskytující se v druhu *Cortinarius orellanus* - pavučinec plyšový. Orelannin narušuje syntézu bílkovin a vytváří volné radikály. Otrava se projevuje po několika dnech, typické jsou zažívací obtíže, po 1 až 2 týdnech dochází k akutnímu selhávání ledvin, které v polovině případů přechází do chronické formy [81].

Dále pak čeleď Tricholomataceae a rod Mycena sp. (helmovky) obsahující toxin muskarin. S muskarinovými otravami se setkáváme také u rodu Inocybe sp. (vláknice) z čeledi Cortinariaceae. Obsah muskarinu je až stonásobně vyšší u druhů rodu Inocybe sp. než např. u *Amanita muscaria*. Otravy se projevují miozou, nejasným viděním, snížením krevního tlaku, salivací, lakrimací, zvýšenou perspirací, astmatickým dýcháním a to 30-120 minut od požití. Specifickým antidotem je atropin ([31], [81]).

Látka koprin byla mimo jiné detekována v čeledi Cortinariaceae, konkrétně v druhu *Pholiota squarrosa*. Koprin způsobuje inhibici acetaldehyddehydrogenasy. To má za následek disulfiramový (antabusový) efekt houbových pokrmů. Požitím

alkoholu do 48 hodin po užití koprinu má za následek kumulaci acetaldehydu, která je příčinou opilosti, červenání tváří, dýchacích obtíží, bolestí hlavy, nevolností [31].

Látka psilocin a jeho ester psilocybin byly nalezeny v některých druzích rodu Inocybe sp. z čeledi Cortinariaceae. Farmakologické působení se projevuje do 30 minut po užití změnami v psychickém stavu [31].

Látky dráždící trávicí ústrojí

O těchto látkách jsou prozatím nedostatečné informace o jejich chemické podstatě. Zdrojem těchto látek je heterogenní skupina rodů a druhů. Řadíme sem některé druhy z rodu Agrocybe sp., čeledi Bolbitiaceae. Tyto druhy mohou způsobit nevolnosti a zvracení. Dále pak rod Dermocybe z čeledi Cortinariaceae. Některé druhy rodu Dermocybe sp. obsahují antrachinonové deriváty dermocybin a dermorubicin způsobující gastritidu. Druhy rodu Mycena jsou obecně označovány za nejedlé. Látky neznámého chemického charakteru způsobují žaludeční podráždění [31].

Houby způsobující alergickou odezvu

Některé druhy rodu Agrocybe sp. jsou příčinou respiračních a kožních reakcí [31].

3.2.7. Příklady biologické aktivity sledovaných rodů hub

Agrocybe

U tohoto rodu byly zjištěny protinádorové účinky. Obsahové látky snižují hladinu cholesterolu v krvi, regulují krevní tlak, mají antioxidační účinky. Z plodnic *Agrocybe aegerita* bylo získáno antimykotikum [22].

Druhy *A. pediades* a *A. aegerita* vykazovaly antimykotické, antioxidační a antibakteriální účinky (*Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis, Myotis flavus, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa*) ([82], [83]). β-glukany v druhu *A. chaxing* působí protizánětlivě a proti tumorům [84]. Stejně tak u druhu *A. aegerita* byl zjištěn účinek proti rakovině [85]. Látka agrocybin získaná z druhu *A. perfecta* vykazovala efekt proti rekombinantnímu enzymu trypanothionreduktasy (TryR)

z *Trypanosoma crusi*, dále působí proti lymfocytární proliferaci v lidských periferních mononukleárních buňkách a proti lidské kancerogenní linii buněk UACC-62 (melanom), proti MCF-7 (prsa) a TK-10 (ledviny) [86].

U druhu *A. cylindracea* byl pozorován protistárnoucí účinek u myší. Konkrétně byla zjištěna redukce obsahu malonaldehydu (MDA) a celkového obsahu cholesterolu, došlo ke značnému vylepšení aktivity superoxiddismutazy (SOD), glutathionperoxidazy (GSH-Px), a celkové antioxidacni kapacity (T-AOC) [87].

Cortinarius

Zjištěna antibakteriální aktivita (*Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa*). Antrachinonové pigmenty společně s emodinem, physcionem a erytrogluacinem vykazovaly antimikrobiální aktivitu. Houbové oktaketidy austrocortilutein, austrocortirubin, torosachrysone, physcion a emodin inhibují *Staphylococcus aureus*. *Pseudomonas aeruginosa* je potenciálně inhibovaná fyscionem a emodinem [30]. U rodu Cortinarius sp. byla jednoznačně stanovena inhibiční aktivita vůči cholinesterasám, například druh *C. infractus* obsahuje látku infractopicrin vykazující aktivitu proti AChE [34], nebo *C. brunneus* s obsahovou látkou brunnein A, která slabě inhibuje AChE [32].

Gymnopilus

Druh *G. junonius* vykazoval antioxidační, antimykotické a antibakteriální účinky (*Bacillus subtilis, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa*) [82].

Inocybe

Druh *I. umbrinela* vykazoval protinádorový účinek, zjištěna inhibice HIV-1 reverzní transkriptasy, u druhu *I. geophylla* byl zjištěn antibakteriální účinek (*Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis*) ([88], [89]).

Mycena

U některých druhů rodu Mycena sp. byla zjištěna přítomnost látky mycenonu, která inhibuje isocitrát lyasu [90], dále pak látka strobilurin s antimykotickým účinkem [91] a antibiotickým efektem [92]. U hub rodu Mycena sp. zjištěná látka

s názvem favolon B má podle [60] antimykotický účinek. U druhu *M. leaiana* byla izolována látka leaianafulven s antibiotickými i cytostatickými účinky [70]. Přímo u testovaného druhu *M. tintinnabulum* byla izolována látka tintinnadiol [76], která vykazuje cytotoxickou aktivitu proti kancerogenní linii buněk HL-60 (promyelocytární leukémie).

Rozites

Konkrétně druh *R. caperata* vykazoval účinek proti herpetickým virům [93].

3.3. Antioxidační aktivita

3.3.1. Volné radikály (VR)

Za volný radikál je považována jakákoliv molekula, atom nebo ion, jenž má ve valenční sféře jeden nebo více nepárových elektronů a je schopen alespoň krátké samostatné existence. Jejich vlastností je vysoká reaktivita, nestabilita. Vznikají homolytickým štěpením kovalentní vazby molekuly, další možností je ztráta elektronu (oxidace) nebo jeho přijetí (redukce). Volný radikál se typicky stabilizuje vytržením elektronu z jiné struktury, čímž dochází k přeměně struktury na jiný radikál. Tento proces může vyústit v řetězovou reakci a stát se příčinou poškození organismu (poškození lipidů, proteinů, glycidů a DNA) ([10], [94]).

Velké množství radikálů vzniká během metabolismu nebo se do organismu dostávají ze zevního prostředí. Mezi obecné příčiny patří toxémie, infekce, hypoxie – ischémie, xenobiotika, hyperlipidemie, hyperproteinemie, hyperglykemie, záněty, onkologické procesy, fagocytární a imunitní reakce, či zvýšené metabolické aktivity [95].

3.3.2. Reaktivní formy kyslíku a dusíku

Reaktivní formy kyslíku (ROS) jsou meziprodukty redukce kyslíku na vodu. Dýchací řetězec mitochondrií a pak také aktivované fagocyty pomocí NADPH oxidasy generují superoxidový radikál $O_2^{\bullet -}$ (vzniká redukcí jednoho elektronu molekuly kyslíku). $O_2^{\bullet -}$ se působením superoxiddizmutasy přeměňuje na méně nebezpečný peroxid vodíku (může vzniknout i spontánně). Peroxid vodíku je organismem přeměňován pomocí enzymu katalasy nebo glutathionperoxidasy

na vodu (přirozená antioxidační ochrana organismu). Na druhou stranu se peroxid vodíku vyznačuje vysokou reaktivitou s přechodnými kovy vyskytujícími se v těle (železo, měď). Tato reakce se nazývá Fentonovou reakcí a je producentem nejnebezpečnějšího hydroxylového radikálu OH•. ROS se mohou účastnit přeměny energie, která je nezbytná pro životní procesy. Dále pak se mohou účastnit enzymových mechanismů, podílet se na činnosti buněčného informačního systému, kde plní funkci signálních molekul. Škodí pouze tehdy, vymknou-li se přísné kontrole. Existují i radikály, jejichž volný elektron patří jinému atomu než kyslíku, nejčastěji se jedná o atom dusíku. Hlavním představitelem je NO•. I ten může poskytovat celou řadu jiných sloučenin typu VR, i bez nepárového elektronu. V tomto případě se souhrnně označují jako reaktivní formy dusíku (RNS). Jako radikály se chovají i atomy přechodných kovů (nikl, mangan, titan, železo aj.) ([10], [94], [96]).

3.3.3. Ochrana lidského těla před volnými radikály

Látky, které brání oxidačnímu působení volných radikálů, jsou souhrnně označovány za **antioxidanty (AO).** Antioxidanty jsou rozdělovány na umělé a přirozené. Do **přirozených** AO jsou řazeny látky (hormony, enzymy), které se vytvářejí v organismu, nebo se jedná o látky přijímáné v potravě.

Z enzymů se jedná o již zmiňovanou superoxiddizmutasu, katalasu, glutathionperoxidasu. Dalšími přirozenými AO jsou vitamíny, aminokyseliny, polyfenoly a bioflavonoidy, koenzym Q10, estrogeny, selen, germanium, zinek, kyselina alfa lipoová, karotenoidy, L-karnitin, melatonin, somatotropin aj. ([10], [95], [97]).

Do **umělých** AO řadíme celou řadu léčiv a také látek přirozených, jež jsou modifikovány a získávají tak jiné požadované vlastnosti [10].

3.3.4. Rovnováha mezi antioxidanty a volnými radikály

Za normálního stavu existuje v těle rovnováha mezi VR a AO. Převaha jedné ze složek, může znamenat poškození organismu. Dojde-li k vzestupu hladiny VR v buňkách (větší než normální množství), označujeme tento jev za **oxidační stres.** V těle může nastat i situace, kdy převaha AO umocňuje oxidační stres,

anebo blokuje VR, jež jsou nezbytné pro organismus. K oxidačnímu stresu dochází téměř u všech chorob. Nicméně ne všechny formy oxidačního stresu jsou špatné, bez některých jeho forem by živé buňky nebyly schopny existence. Řídí důležité metabolické cesty, které produkují nové tkáně, hojí rány, podporují růst. Dále napomáhají tělu adaptovat se na onemocnění, stres ([10], [95]).

3.3.5. Onemocnění způsobená přítomností volných radikálů

Volné radikály mohou být příčinou vzniku onemocnění, jindy zhoršují nebo komplikují průběh nemoci. Příklady onemocnění, v jejichž etiopatogenezi hrají roli volné radikály: infarkt myokardu, ateroskleróza, revmatoidní artritida, diabetes, nádorová onemocnění, katarakta, makulární degenerace, choroby kůže, uší, zubů, neurodegenerativní onemocnění (Parkinsonova a Alzheimerova choroba), oční choroby, onemocnění trávicího traktu, onemocnění ledvin aj.

V posledních letech vzniklo několik desítek teorií stárnutí, z nichž nejvýznamnější je volně radikálová teorie. Ve stáří byla prokázána snížená antioxidační ochrana organismu tvořená redukovaným glutathionem, glutathionperoxidasou, katalasou, karotenoidy, estrogeny, Mg, Se, Zn. Dále se snižuje schopnost reparovat poškozené biomolekuly. Naopak dochází k nárůstu intracelulárního vápníku, oxidované LDL, produkty lipoperoxidace atd. ([10], [11]).

3.4. Alzheimerova choroba

Alzheimerova choroba je progresivní neurodegenerativní onemocnění, projevující se obvykle po 65. roce života změnou osobnosti, poruchami paměti, ztrátou rozpoznávacích schopností, alexii a někdy i afázii. Prohlubující se nemoc končí smrtí [96].

3.4.1. Epidemiologie

Touto nemocí trpí celosvětově 10 % populace ve věku nad 65 let. Ve věkové kategorii nad 85 let tato choroba postihuje v klinicky různě závažné podobě necelou polovinu populace, přičemž ohroženější je skupina žen. Prokázalo se, že za 67 % všech případů demence odpovídá Alzheimerova nemoc (AN). Z epidemiologických výzkumů vyplývají také rizikové vlivy, které se mohou podílet na rozvoji nemoci [98].

Rizikové faktory

Bezesporu k nim patří věk, familiární agregace případů, genové mutace (Downův syndrom), nosičství alely eta-4 genu pro apolipoprotein E, či arteriální hypertenze. Jako možné riziko se uvádí nízké vzdělání a kraniocerebrální poranění. Nevyjasněn byl vztah mezi nemocí a kouřením cigaret, hliníkem, zinkem a vyšší hladinou sérového homocysteinu. Některé práce nachází souvislost se vznikem AN u lidí s vyšším příjmem tuků a diabetem ([98], [99], [100]).

Možnosti snížení výskytu AN

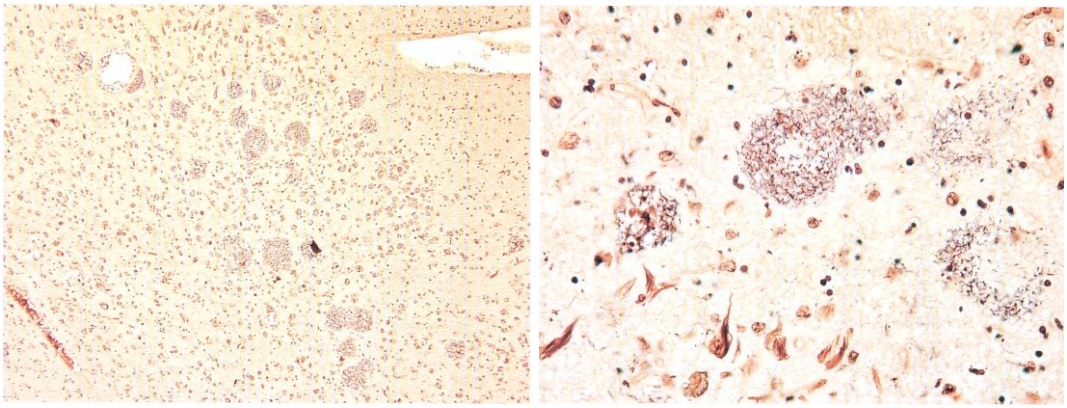
Předmětem výzkumu je nízký výskyt nemoci v souvislosti s užíváním nesteroidních antirevmatik, statinů a antioxidantů, dále pak vysokou hladinou estrogenů u žen užívající hormonální terapii v postmenopauze ([98], [99]).

3.4.2. Mikroskopické a patogenetické změny

Mikroskopicky se projevují změny extracelulární i intracelulární. Hlavní extracelulární změnou je ukládání patologické bílkoviny β-amyloidu. Tato bílkovina vytváří shluky, kolem kterých dochází k neurodegenerativním procesům a následné tvorbě senilních plaků (byla zjištěna přímá úměra mezi

množstvím plak a tíží demence). Amyloidní peptid β (Aβ) o délce 39-42 aminokyselin vzniká z amyloidního prekurzorového proteinu (APP). Při fyziologických proteolytických úpravách APP α-sekretasou vzniká solubilní peptid APPs, chránící neurony před glutamátovou neurotoxicitou. Za patologických okolností se na štěpení podílejí enzymy β- a γ- sekretasa, které štěpí APP na jiném místě než α-sekretasa. Vznikají tak fragmenty, které přestávají být solubilní, začínají koagulovat a následně polymerizovat. Tímto způsobem vzniká β-amyloid, který tvoří shluky jako základ plak (Obr. 16). Kolem těchto shluků dochází k apoptóze neuronů ([96], [101]).

Hlavní intracelulární změnou u AN je degenerace τ-proteinu. Tato bílkovina je spojena s neuronálními vlákny. T-protein je nadměrně fosforylován, tím dochází k tvorbě neuronálních klubek (Obr. 16) a následnému zániku neuronů především ve frontálním, parietálním a temporálním laloku [101].



Obr. 16: vlevo – senilní plaky v mozkové kůře (zvětšeno 40x), vpravo – detailní obrázek senilních plaků bez amyloidového jádra, v dolní části neurony s neuronálními klubky (zvětšeno 200x) (zdroj [99]).

Významně je postižen cholinergní systém. Je narušen presynaptický oddíl acetylcholinergního neuronu, vstupu cholinu do neuronu, syntéza acetylcholinu i jeho uvolňování. Acetylcholin je tvořen z acetyl-koenzymu A a z cholinu pomocí enzymu cholinacetyltransferasy. Tento enzym je při onemocnění Alzheimerovou chorobou deficitní. Acetylcholin je po ukončení vazby na receptor odbouráván pomocí enzymu acetylcholinesterasy. U AN se uplatňuje ještě enzym butyrylcholiesterasa, který je za fyziologických podmínek v CNS bezvýznamný.

Za patologických je tento enzym vytvářen v mobilizovaných gliových elementech, vytvářející zánětlivý lem plaků [101].

Účast reaktívních forem kyslíku a dusíku (RNOS) na rozvoji nemoci

Patologické štěpení APP β- a γ- sekretasou může podle [96] receptorovým mechanismem vyvolat excitotoxické reakce a tvorbu RNOS. Aβ se pak ukládá s modifikovanými biomolekulami do agregátů v senilních placích. Jak dále uvádí [96], v patogenezi Alzheimerovy choroby mohou hrát roli také glykační procesy a jimi vyvolané patologické signalizační reakce vedoucí k produkci RNOS, k aktivaci zánětlivých procesů a k tvorbě neurofibrilárních spletí.

Zatím se RNOS ukazují jako faktory zrychlující bludné biochemické kruhy, ve kterých se jednotlivé děje stále zintenzivňují až do vyústění závěrečného ničivého procesu nekrózy nebo apoptózy [96].

V souvislosti s rozvojem nemoci s oxidačním stresem a VR, Koukolík s Jirákem [98] poukazují na špatnou odlišitelnost příčiny od následku. Bez ohledu na nevyřešenou otázku, zda jsou volné radikály příčinou nebo následkem, součástí patogenetického řetězu být mohou, takže v terapii nemoci je nutné tyto vlivy zohlednit. Primárních příčin nemoci je bezpochyby více, většina je jich však bohužel neznámá [96].

3.4.3. Terapie Alzheimerovy nemoci

Vzhledem k ne zcela jasné etiologii a patogenezi Alzheimerovy nemoci, není možná kauzální terapie. Je nutno kombinovat farmakoterapii a jiné typy terapie [101].

Farmakoterapie

Kognitivní farmakoterapie

Prozatím byla účinnost ověřena jen u léčiv ze skupiny inhibitorů acetylcholinesteráz. Využití těchto léčiv vychází ze zjištění poruchy acetylcholinergní transmise. Dalším důležitým zjištěním je, že se molekuly mozkových cholinesteras podílejí na formaci β-amyloidu (studie s pozitronovou emisní tomografií prokázaly přítomnost cholinesteras i v těch oddílech mozku,

kde nejsou distribuovány acetyl-cholinergní neurony). V současné době jsou u nás používány 3 typy inhibitorů cholinesteras – rivastigmin, galantamin a donepezil.

U těžkých stavů nemoci je používání léčiv z této skupiny sporný. Naopak byl prokázán účinek blokátoru ionotropních receptorů excitačních aminokyselin memantinu.

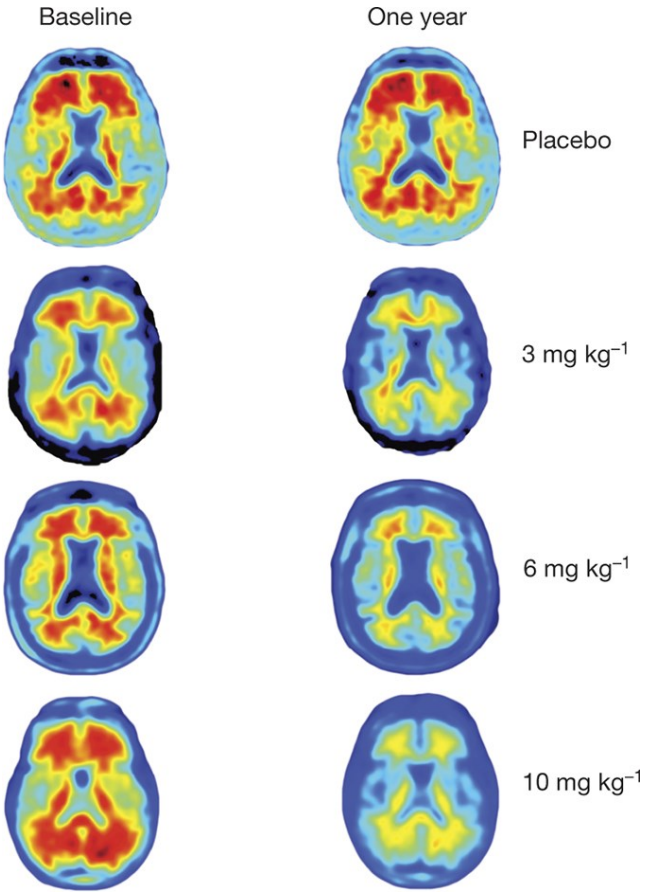
S inhibitory cholinesteras jsou v běžné praxi kombinovány další skupiny látek: scavengery volných kyslíkových radikálů, nootropika, extractum ginkgo biloba EGb761, inhibitory monoaminooxidasy typu B, nesteroidní antirevmatika procházející HEB, prekurzory nervových růstových hormonů, dehydroepiandrosteron, u postklimatických žen estrogenní substituce atd. [101].

Nekognitivní farmakoterapie

Tato terapie působí proti behaviorálním a psychologickým příznakům demence. Řadíme sem léčiva ze skupiny antipsychotik, antidepresiv, hypnotik.

Perspektivní farmakoterapeutické přístupy (zatím nepoužívané)

V roce 2002 byla u myší, kterým byl do jejich genetického materiálu implantován zmutovaný lidský gen z 21. chromosomu, provedena vakcinace lidským β-amyloidem. U dospělých myší, kde již byla depozita β-amyloidu vytvořena, došlo k rozpuštění, u mláďat, kde vytvořen nebyl, vedla vakcinace k tomu, že se ani nevytvořil. Při studiích na lidech byl celkový efekt nižší než u myší. Jako nadějnější se zdá být imunizace monoklonálními protilátkami proti β-amyloidu. V nedávné minulosti byl publikován článek v prestižním časopise Nature, ve kterém autoři [102] popsali monoklonální protilátku *aducanumab*, jež byla během klinických studií aplikována intravenózně pacientům s Alzheimerovou chorobou. Výsledkem byla redukce β-amyloidu (Obr. 17) v závislosti na čase a dávce *aducanumabu*.



Obr. 17: redukce senilních plaků, zobrazeno pomocí pozitronové emisní tomografie; vlevo počátek léčby, vpravo stav v 54 týdnu [102].

Nicméně výzkum účinku vakcinace stále probíhá, o čemž svědčí i výsledky první klinické studie týmu Petra Nováka [103], který použil vakcínu AADvac1, jenž se ukazuje být bezpečnou léčbou tau proteinem (účinnost se bude testovat v dalších fázích studie). Další perspektivní možností je syntéza látek blokující působení β- a γ-sekretas. Jako nadějné se ukazuje užití antidiabetika rosiglitazonu. Otázka genových manipulací je rovněž zkoumána jako jedna z možností, konkrétně náhrada zmutovaného genu správným genem pomocí nosičů na principu viru, nebo blokáda ribonukleových kyselin přenášejících patologickou informaci. Jinou nadějnou metodou je použití některých protektivních peptidů, analogu peptidu humaninu, jenž snižuje toxicitu β-amyloidu, dále pak implantace lidských kmenových buněk do mozku postižených AN, zde věda naráží na etický problém s využitím embryonálních kmenových buněk ([99], [104]).

4. Experimentální část a výsledky

4.1. Potřeby

4.1.1. Rozpouštědla a chemikálie

Rozpouštědla

Ethanol (EtOH) (Penta)
Chloroform ($CHCl_3$) (Penta)
Voda superčistá (voda)

Chemikálie

Acetylthiocholin jodid (Sigma-Adrich)
2,2´-azinobis (3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina) (ABTS) (Sigma-Adrich)
Butyrylthiocholin jodid (Sigma-Adrich)
5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina (DTNB) (Sigma-Adrich)
Dusičnan bismutitý zásaditý (Sigma-Adrich)
Folin-Ciocalteu činidlo (F-C činidlo) (Sigma-Adrich)
Fosfátový pufr pH 7,4 (chemikálie pro přípravu pufru: dihydrát dihydrogenfosforečnanu sodného, p.a. (Lachema); dodekahydrát hydrogenfosfrečnanu disodného, p.a. (Lachema)
Galantamin hydrobromid (Changsha Organic Haerb Inc., China)
Huperzin A (TAZHONGHUI – Tai´an zhonghui Plant Biochemical Co., Ltd.,China)
Jodid draselný (Sigma-Adrich)
Kyselina askorbová (Sigma-Adrich)
Kyselina gallová (Sigma-Adrich)
Kyselina vinná (Sigma-Adrich)
Persulfát draselný (Sigma-Adrich)
Skulerin (izolováno na katedře farmaceutické botaniky a ekologie)
Trolox (Sigma-Adrich)
Uhličitan sodný (Sigma-Adrich)

4.1.2. Přístrojové vybavení

- Počítačově řízený (pomocí programu FIAlab for Windows 5.0) FIAlab 3000 analyzátor (FIAlab Instruments Inc., Bellevue, WA, USA) opatřený pístovým čerpadlem o objemu 2,5 ml, šesticestným selekčním ventilem, USB2000-UV/VIS spektrofotometrem s halogenovou lampou LS-1 (Ocean Optics, USA)

a průtokovou detekční celou SMA-Z s optickou délkou 1 cm; objem mísící cívky je 0,6 ml a spojovací teflonové hadičky (PTFE; Watrex, Prague, Czech Rep.) mají průměr 0,72 mm.

- Spektrofotometr Shimatzu UV-1611 (Shimatzu, Columbia, Maryland, USA).
- Ultrazvuková lázeň SONOREX Super 10P (Bandelin, Německo).
- Vakuová odparka Rotavapor R-114 a vodní lázeň Waterbath B-480 (Büchi, Švýcarsko).

4.1.3. Detekční činidlo

Dragendorffovo činidlo podle Muniera

Roztok A: 1,7 g zásaditého dusičnanu bismutitého a 20 g kyseliny vinné bylo rozpuštěno v 80 ml destilované vody.

Roztok B: 16 g jodidu draselného bylo rozpuštěno ve 40 ml destilované vody.

Zásobní roztok byl připraven smícháním roztoku A a B v poměru 1:1 (v/v), jenž může být v lednici uchováván několik měsíců.

Detekční roztok byl připraven rozpuštěním 10 g kyseliny vinné v 50 ml destilované vody a přidáním 5 ml zásobního roztoku. Alkaloidy byly po reakci s detekčním činidlem zbarveny oranžově [105].

4.1.4. Vyvíjecí soustavy pro tenkovrstvou chromatografii

S1 : toluen + chloroform + ethanol (95%) + diethylamin = 70 + 20 + 10 + 4 (v ml)

S2 : toluen + aceton + ethanol (95%) + hydroxid amonný = 40 + 40 + 6 + 2

S3 : chloroform+ ethanol (95%) +diethylamin = 80 + 12,5 + 7,5

S4 : aceton + diethylamin = 90 + 10

4.1.5. Chromatografický adsorbent

TLC oxid hlinitý 60 F_{254}, neutrální (Merck, Německo)

TLC silikagel 60 F_{254} (Merck, Německo)

4.1.6. Testované druhy hub

V této práci byly zpracovány extrakty z *Agrocybe molesta, Agrocybe preacox, Dermocybe cinnamomeobadia, Dermocybe semisanquinea, Dermocybe*

sapineus, Inocybe erubescens, Inocybe fastigiata, Inocybe fraudans, Inocybe geophylla, Mycena epipterygia, Mycena galericulata, Mycena pura, Mycena rosea, Mycena tintinnabulum a Rozites caperata.

4.2. Metody

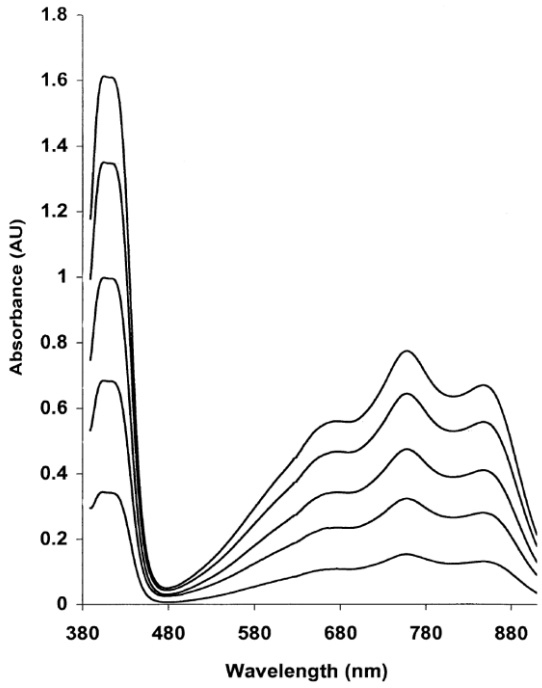
4.2.1. Postup přípravy houbových extraktů

Navážený očištěný vzorek plodnice houby (max. 15g) byl po rozmixování extrahován 70% ethanolem (poměr houby v (g) k 70% EtOH v (ml), jenž musí být minimálně 80 ml, je 1 : 15). Extrakce probíhala sonikací v ultrazvukové lázni při teplotě 22 °C, intenzitě 10, po dobu 30 minut. Filtrací byl oddělen pevný podíl od extraktu. Pevný podíl byl ještě poté promyt třikrát 10 ml 70 % EtOH a opět zfiltrován. Filtrát byl dále odpařen na vakuové rotační odparce za sníženého tlaku při teplotě 50 °C až do veškerého odstranění rozpouštědla. K zahuštěnému extraktu bylo přilito 10 ml superčisté vody a poté byl roztok zfiltrován přes křemelinu na filtračním tubusu za sníženého tlaku do 100 ml baňky. Filtrační vrstva byla ještě promyta třikrát 5 ml superčisté vody. Z extraktu byla částečně odpařena voda za pomocí rotační odparky až do vzniknutí medové konzistence. Následně byl extrakt dobře uzavřen a uschován v lednici. Poté proběhla lyofilizace. Lyofilizát byl umístěn přes noc do exsikátoru nad silikagel, kde došlo k odstranění zbytkové vody. Následovalo přeplnění extraktu do vzduchotěsné penicilinky, převrstvení argonem a uzavření. Takto připravené extrakty byly uschovány v mrazničce a staly se výchozím materiálem pro řadu stanovení. (pro veškeré analýzy této práce byly použity houbové extrakty, které byly připraveny v rámci předešlých diplomových prací a dizertační práce Ing. Kateřiny Macákové, Ph. D. na katedře botaniky a ekologie farmaceutické fakulty v Hradci Králové).

4.3. Stanovení antioxidační aktivity ABTS testem s využitím SIA

Metoda pro stanovení antioxidační aktivity je založena na odbarvení zelenomodrého $ABTS^{\cdot+}$ radikálu antioxidantem. Tvorba $ABTS^{\cdot+}$ radikálu se stala základem jedné ze spektrofotomotrických metod pro měření antioxidační aktivity roztoků čistých látek, vodných směsí a tekutin obecně. Princip tvorby $ABTS^{\cdot+}$

radikálu spočívá v oxidaci 2,2´-azinobis (3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonové kyseliny) persulfátem draselným. Přítomností antioxidantu v tekutině, který se stává donorem vodíku, dochází k redukci radikálu a jeho současnému odbarvení, jak již bylo zmíněno. Míra redukce závisí na koncentraci antioxidantu, době trvání reakce a samotné antioxidační aktivitě testované látky. Při testování antioxidační aktivity se sleduje pokles absorbance, čili redukce $ABTS^{\cdot+}$ radikálu, v charakteristických vlnových délkách. Jinými slovy, čím vyšší je antioxidační aktivita, tím větší je redukce $ABTS^{\cdot+}$ radikálu a větší pokles absorbance. V původní studii [106] byla testována absorbance v různých vlnových délkách s tím, že byla zjištěna (mimo běžně používané maximum 415 nm) maxima při vlnové délce 645 nm, 734 nm a 815 nm. Z posledních tří uvedených maxim byla největší absorbance při 734 nm (viz Obr. 18). Metoda je aplikovatelná pro antioxidanty, které jsou rozpustné jak ve vodě, tak v tucích, dále pro čisté látky a extrakty.



Obr. 18: Maxima absorbance dle [106].

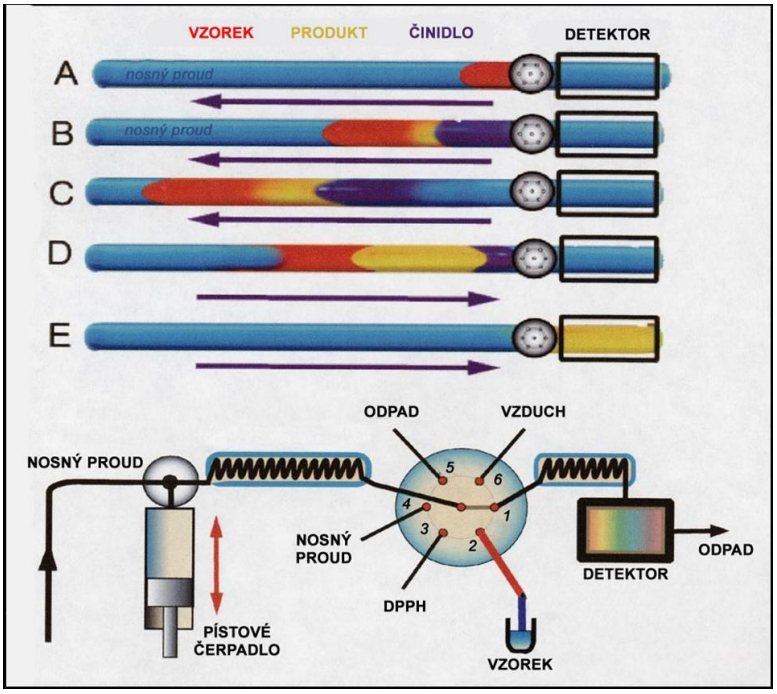
4.3.1. Sekvenční injekční analýza (SIA)

Jak uvádí [107], tak počítačově řízený systém sekvenční injekční analýzy (SIA) vybavený spektrofotometrickým diodovým detektorem je použit pro rychlý monitoring a hodnocení antioxidačních účinků (či schopnosti vyplavovat radikály)

biologických vzorků. S optimalizovanou SIA procedurou lze detekovat až mikromolární koncentrace modelových antioxidantů jako kyselina askorbová, kávová, (+) katechin, (−) epikatechin a rutin; a lze hodnotit koncentrace těchto antioxidantů v rozsahu mikromolů až milimolů. Takto lze zpracovat až 45 vzorků za hodinu. Díky své rychlosti a citlivosti je SIA metoda vhodná pro vykonávání rutinních testů (screeningů) přítomnosti různých antioxidantů ve velkých sériích lyofilizovaných bylinných nebo houbových extraktů (množství vzorku nutné pro analýzu je několik miligramů).

4.3.2. Princip metody SIA

Analyt obsažený v roztoku vzorku je převeden na detekovatelný produkt. Produkt je získán smísením vzorku a činidla a jejich následnou chemickou reakcí v toku nosného proudu. S využitím šesticestného ventilu a pístového čerpadla je nejprve aspirována zóna nosného proudu, poté zóna vzorku, zóna činidla a nakonec opět zóna nosného proudu. Po aspiraci všech zón je pohyb čerpadla obrácen a dochází k promísení vzorku s činidlem. Reakční produkt je unášen do průtokového detektoru s diodovým polem a je měřena absorbance tohoto produktu. Odezva detektoru má podobu tzv. píků (lokálních maxim grafu detektoru). Součástí SIA systému je mikroprocesor (PC) s programovým vybavením, který řídí jednotlivé kroky cyklu, sbírá a vyhodnocuje výstupní data. Schematicky je výše popsaný princip znázorněn na Obr. 19. Optimální teplota provádění SIA experimentů je 22 ± 1 °C. Doporučuje se provádět měření třikrát (u některých vzorků je vhodné provést i 10 měření). Optimální hodnota pH pro měření SIA je 5 [107].



Obr. 19 – schéma zapojení systému SIA.

4.3.3. Přístrojová technika SIA

Veškeré SIA experimenty byly prováděny pomocí počítače kontrolovaného analyzéru FIAlab 3000 (s podporou operačního systému Windows®) vybaveného pístovým čerpadlem s objemem 2,5 ml, šesticestným selekčním ventilem, spektrofotometrem USB2000-UV/VIS se zdrojem světla LS-1, průtokovou detekční celou SMA-Z a mísící cívkou [107].

4.3.4. Postup práce

Pro získání roztoku $ABTS^{\cdot+}$ radikálu bylo nutné přidat roztok persulfátu draselného ($K_2S_2O_8$) v koncentraci 2,4 mM k roztoku ABTS (2,2´-Azinobis (3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina)), který byl o koncentraci 7 mM. Směs byla ponechána při pokojové teplotě a během noci došlo k vytvoření $ABTS^{\cdot+}$ radikálu. Následně bylo odpipetováno 500 µl do mikrozkumavky a uloženo v mrazničce. Jako rozpouštědlo pro přípravu vzorků byl použit 50% EtOH, stejně tak byl využitý jako slepý vzorek a nosný proud v systému. Předtím než mohlo začít samotné měření, bylo nutné změřit hodnotu poklesu absorbance (hodnota by měla být přibližně 0,7 ± 0,02) u slepého vzorku. Následovalo měření standardu (trolox) postupně po setinách v koncentracích od 0,01 až do 0,06 mM. Z hodnot závislosti

procentuálního poklesu absorbance na koncentraci troloxu byla sestrojena přímka lineární regrese o určitém sklonu pomocí programu GraphPad Prism 5.02 ($R^2 > 0.98$). Na závěr byly měřeny vzorky houbových extraktů, aby jejich aktivita byla přibližně 20-80%. Předtím než byly sestrojeny křivky závislosti aktivity vzorku na koncentraci jednotlivých vzorků, bylo potřeba tyto vzorky odvzdušnit v ultrazvukové lázni. Veškerá měření byla provedena ve třech opakováních a absorbance byla měřena při vlnové délce 734 nm.

Antioxidační aktivita vzorků byla vyjádřena pomocí vztahu:

TEAC = sklon přímky vzorku / sklon přímky troloxu

Pro srovnání byla změřena antioxidační aktivita kyseliny askorbové.

4.4. Stanovení celkového množství fenolických látek

Obsah celkového množství fenolických látek v etanolových extraktech hub byla stanovena pomocí Folin-Ciocalteu metody [108]. Principem metody je přidání F-C činidla společně s uhličitanem sodným ke stanovovaným extraktům za vzniku modrého zbarvení. U takto vzniklého produktu je měřena absorbance pomocí spektrofotometru při vlnové délce 765 nm. S narůstající koncentrací fenolických látek ve stanovovaných extraktech roste také absorbance. Celkový obsah fenolických látek vzorku se porovnává se standardem kyseliny gallové.

4.4.1. Postup

Nejprve byla naměřena kalibrační křivka. Pro její přípravu bylo potřeba smíchat 0,25ml ethanolového roztoku kyseliny gallové (v koncentracích 0,025-0,25 mg/ml) s 1,25 ml F-C činidla a 1 ml 7,5% uhličitanu sodného.

Množství fenolických látek bylo odečteno z kalibrační křivky pomocí UV Probe programu a vyjadřuje se jako ekvivalentní množství kyseliny gallové na mg extraktu (GAE/mg). Absorbance byla stanovena po 30 minutách za pokojové teploty a při vlnové délce 764 nm (spektrofotometr Shimadzu UV-1601, software UV Probe).

Se stejným reagentem bylo smícháno 0,25 ml ethanolového houbového extraktu (1 mg/ml) a absorbance byla měřena opět po 30 minutách za pokojové teploty při vlnové délce 765 nm. Měření byla provedena ve třech opakováních.

Celkový obsah fenolických látek byl stanoven z kalibrační křivky pomocí softwaru UV Probe a vyjádřeno jako ekvivalent kyseliny gallové na 1 mg extraktu.

4.5. Důkaz přítomnosti alkaloidů pomocí TLC

Vzorky byly připraveny rozpuštěním 20 mg lyofilizátu v 1 ml rozpouštědla (50% EtOH). Tenkovrstvá chromatografie byla prováděna vzestupným způsobem v chromatografických komorách sycených jednu hodinu parami elučních soustav.

4.5.1. Faktické údaje

Adsorbent: TLC oxid hlinitý 60 F_{254}, neutrální (Merck, Německo) a TLC silikagel 60 F_{254} (Merck, Německo).

Dráha: 80 mm

Soustavy: S1 : toluen + chloroform + ethanol (95%) + diethylamin = 70 + 20 + 10 + 4 (v ml)

S2: toluen + aceton + ethanol (95%) + hydroxid amonný = 40 + 40 + 6 + 2

S3: chloroform + ethanol (95%) +diethylamin = 80 + 12,5 + 7,5

S4 : aceton + diethylamin = 90 + 10

Standard: Skulerin

Dráhy jednotlivých vzorků hub: 1 – 16 (Tab. 2)

Detekční činidlo: Dragendorffovo činidlo podle Muniera

Tab. 2: Přehled značení jednotlivých zkoumaných druhů.

Číslo vzorku u TLC	Označení vzorku	Druh
1	F011-04	*Agrocybe molesta* (Lasch) Sing.
2	F004-01	*Agrocybe praecox* (Pers.:Fr.)
3	F051-04	*Dermocybe cinnamomeobadia* (R.Hry.) Mos.
4	F098-01	*Dermocybe semisanguinea* (R.Hry.) Mos.
5	F187-02	*Gymnopilus sapineus (*Fr.)R.Maire
6	F053-01	*Inocybe erubescens* Blytt
7	F049-03	*Inocybe fastigiata* (Schaeff.:Ex.Fr.) Quél.
8	F178-02	*Inocybe fraudans* (Britz.)Sacc.
9	F034-04	*Inocybe geophylla* (Fr.:Fr.)Kummer
10	F125-01	*Mycena epipterygia* (Scop) Fr.
11	F119-01	*Mycena galericulata* (Scop)Fr.
12	F183-02	*Mycena galericulata* (Scop)Fr.
13	F198-02	*Mycena pura* (Pers.:Fr.)
14	F108-01	*Mycena rosea* (Bull.)
15	F122-01	*Mycena tintinnabulum* (Fr.) Quél.
16	F056-03	*Rozites caperata* (Pers.Ex.Fr.) P. Karst.

4.6. Stanovení inhibice AChE a BuChE

Pro stanovení inhibiční aktivity sledovaných houbových extraktů byla použita Ellmanova kolorometrická metoda [109] s použitím 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoové kyseliny (DTNB) modifikovaná podle [110]. Jako substráty se používají estery thiocholinu, jenž jsou cholinesterasami štěpeny na thiocholin a danou kyselinu. Stanovuje se SH- skupina thiocholinu, která se naváže na DTNB, za vzniku žlutě zbarveného produktu. Výsledný produkt se stanovuje spektrofotometricky při vlnové délce 436 nm. Sleduje se nárůst absorbance za 1 minutu. Výhoda této metody tkví v její jednoduchosti, vysoké citlivosti a specifitě reakce.

4.6.1. Materiál

- zdroj acetylcholinesterasy – pouzdra lidských erytrocytů
- zdroj butyrylcholinesterasy – lidská plazma

4.6.2. Přístrojové vybavení

- Spektrofotometr Shimatzu UV-1611 (Shimatzu, Columbia, Maryland, USA).

4.6.3. Příprava lidských erytrocytárních pouzder a plazmy

Nejprve bylo nutné k čerstvě odebrané lidské krvi přidat l ml citrátu sodného (zabraňuje její koagulaci) na 10 ml krve podle upravené metody dle [111]. Následně byla lidská krev centrifugována při rychlosti 4 000 ot./min. za pomocí přístroje Boeco U-32R s rotorem Hettich 1611. Odstředěná plazma byla rozplněna do mikrozkumavek, zatímco erytrocyty byly přemístěny do 50 ml zkumavek a třikrát promyty 5mM fosfátovým pufrem (pH 7,4) se 150 mM chloridu sodného. Opět byl vzorek 10 minut centrifugován rychlostí 12 000 ot./min. přístrojem Avanti J-301, rotor JA-30.50. Očištěné erytrocyty byly smíchány se 40 ml 5mM fosfátového pufru (pH 7,4). Vzniklý roztok byl následně míchán 10 minut, čímž došlo k rozpadu erytrocytů. Poté byly červené krvinky centrifugovány rychlostí 20 000 ot./min. Vzniklá erytrocytární pouzdra byla třikrát promyta fosfátovým pufrem.

4.6.4. Postup

Nejprve byl připraven slepý vzorek. Do kyvety bylo postupně přidáváno 10-25 µl lidských erytrocytárních pouzder nebo plazmy, 200 µl 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoové kyseliny (DTNB), 25 µl 50 % ethanolu a dále pak doplněno na objem 900 µl 0,1 M fosfátovým pufrem (pH 7,4). K takto připravenému vzorku bylo přidáno 100 µl substrátu (acetylthiocholin jodid nebo butyrylthiocholin jodid). Nárůst absorbance byl měřen při vlnové délce 436 nm. Měření bylo provedeno ve třech opakováních. Pro výpočet nárůstu absorbance byla použita průměrná hodnota. Následovala příprava vzorků. Do kyvety bylo postupně přidáváno 10-25 µl lidských erytrocytárních pouzder nebo plazmy, 200 µl 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoové kyseliny (DTNB), 25 µl měřeného vzorku v různých koncentracích a doplněno na objem 900 µl 0,1 M fosfátovým pufrem (7,4 pH). Stejně jako u přípravy slepého vzorku bylo na závěr přidáno 100 µl substrátu (acetylthiocholin jodid nebo butyrylthiocholin jodid). Nárůst absorbance byl měřen při vlnové délce 436 nm. Měření bylo provedeno ve třech opakováních.

Výpočet poklesu ΔA proběhl podle vztahu:

$$\% \text{ pokles } \Delta A = 100 - (\Delta A_{SA} / \Delta A_{BL} * 100)$$

kde ΔA_{SA} - nárůst absorbance za 1 minutu u testovaného vzorku, ΔA_{BL} – nárůst absorbance za 1 minutu u slepého vzorku.

Z vypočítaných hodnot byla pomocí statistického programu GraphPad sestrojena křivka, ze které byla odečtena hodnota IC_{50} (inhibiční aktivita). Získané výsledky byly porovnány s hodnotami IC_{50} standardů galantaminu a huperzinu A (jedná se o alkaloidy se známou inhibiční aktivitou vůči lidské AChE a BuChE).

- galantamin: IC_{50} HuAChE = 2,59 ± 0,15 μg/ml
  IC_{50} HuBuChE = 58,02 ± 2,34 μg/ml
- huperzin A: IC_{50} HuAChE = 0,061 ± 0,01 μg/ml
  IC_{50} HuBuChE > 500 μg/ml

5. Výsledky

5.1. Vyhodnocení antioxidační aktivity houbových extraktů

Vyhodnocení antioxidační aktivity houbových extraktů (Tab. 3) bylo provedeno pomocí srovnání s antioxidační kapacitou ekvivalentu troloxu (TE mM) dle vztahu uvedeného v kapitole 4.3.

Tab. 3: Hodnoty antioxidačních aktivit u sledovaných taxonů.

vzorek	TE mM
F004-01	0,081
F053-01	0,042
F098-01	0,125
F108-01	0,053
F119-01	0,046
F122-01	0,047
F125-01	0,030
F178-02	0,203
F183-02	0,055
F187-02	0,067
F198-02	0,060
F049-03	0,054
F056-03	0,052
F011-04	0,030
F034-04	0,078
F051-04	0,064
kys. askorbová	4,999

5.2. Výsledky stanovení celkového obsahu fenolických látek

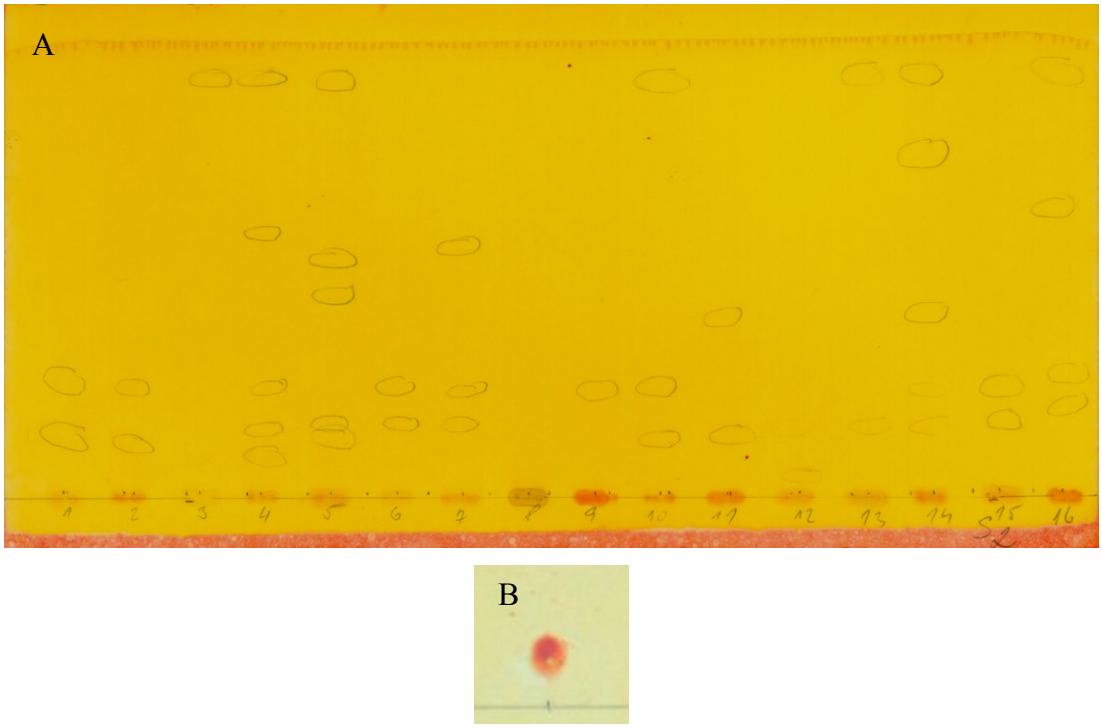
Celkový obsah fenolických látek testovaných houbových extraktů (Tab. 4) byl stanoven pomocí srovnání se standardem kyseliny gallové. Jednotky vyjadřují ekvivalentní množství kyseliny gallové na miligram extraktu.

Tab. 4: Celkový obsah fenolických látek.

vzorek	µgGA/mg ext
F004-01	20,89 ± 0,81
F053-01	17,44 ± 0,09
F098-01	28,18 ± 3,69
F108-01	18,4 ± 0,25
F119-01	20,07 ± 0,36
F122-01	18,57 ± 0,51
F125-01	14,98 ± 3,1
F178-02	40,28 ± 3,73
F183-02	15,5 ± 0,3
F187-02	19,15 ± 0,66
F198-02	17,87 ± 0,38
F049-03	17,87 ± 0,89
F056-03	17,87 ± 0,25
F011-04	18,57 ±0,74
F034-04	21,12 ± 0,3
F051-04	17,24 ± 0,33

5.3. Vyhodnocení reakcí pro detekci na alkaloidy

Detekce na alkaloidy byla u testovaných druhů hub provedena pomocí metody TLC. Na Obr. 20 jsou reakce vzorků hub (A) a standardu skulerinu (B) s detekčním činidlem popsaným v kapitole 4.1.3. Numericky jsou výsledky znázorněny v Tab. 5.



Obr. 20: Detekce přítomnosti alkaloidů (A), reakce standardu skulerinu (B).

Tab. 5: Pozitivní reakce na detekci u sledovaných taxonů.

Číslo vzorku u TLC	Druh	Detekce na alkaloidy
1	*Agrocybe molesta* (Lasch) Sing.	ST 0, 0
2	*Agrocybe praecox* (Pers.:Fr.)	ST 0, 0
3	*Dermocybe cinnamomeobadia* (R.Hry.) Mos.	ST 0, 0
4	*Dermocybe semisanguinea* (R.Hry.) Mos.	ST 0, 0
5	*Gymnopilus sapineus (*Fr.)R.Maire	ST 0, 0
6	*Inocybe erubescens* Blytt	ST 0, 0
7	*Inocybe fastigiata* (Schaeff.:Ex.Fr.) Quél.	ST 0, 0
8	*Inocybe fraudans* (Britz.)Sacc.	ST 0, 0
9	*Inocybe geophylla* (Fr.:Fr.)Kummer	ST 0, 0
10	*Mycena epipterygia* (Scop) Fr.	ST 0, 0
11	*Mycena galericulata* (Scop)Fr.	ST 0, 0
12	*Mycena galericulata* (Scop)Fr.	ST 0, 0
13	*Mycena pura* (Pers.:Fr.)	ST 0, 0
14	*Mycena rosea* (Bull.)	ST 0, 0
15	*Mycena tintinnabulum* (Fr.) Quél.	ST 0, 0
16	*Rozites caperata* (Pers.Ex.Fr.) P. Karst.	ST 0, 0

5.4. Výsledky stanovení inhibiční aktivity houbových extraktů vůči erytrocytární AChE a sérové BuChE

V tabulce 6 jsou výsledky procentuálního poklesu nárůstu absorbance dle vztahu v kapitole 4.6.4. Z vypočítaných hodnot poklesu absorbance byla sestrojena křivka, ze které byla odečtena hodnota IC_{50}.

Tab. 6: Výsledky cholinesterasové inhibiční aktivity.

vzorek	AChE		BuChE	
	IC_{50} µg/ml	% inhibice c=500 µg/ml	IC_{50} µg/ml	% inhibice c=500 µg/ml
F004-01	>500	25,45 ± 2,32	>500	23,56 ± 1,63
F053-01	>500	35,8 ± 1,07	>500	19,27 ± 0,92
F098-01	>500	23,5 ± 1,72	>500	17,46 ± 1,88
F108-01	515,7	46,39 ± 0,6	>500	13,64 ± 0,79
F119-01	487,3	51,85 ± 0	>500	27,31 ± 0,54
F122-01	>500	19,64 ± 1,79	>500	28,1 ± 1,41
F125-01	>500	13,54 ± 0	>500	8,95 ± 1,74
F178-02	>500	13,87 ± 1,19	>500	- -
F183-02	>500	9,88 ± 1,75	>500	11,75 ± 1,84
F187-02	>500	40,61 ± 1,24	>500	33,94 ±0,92
F198-02	>500	12,85 ± 2,48	>500	15,14 ± 1,63
F049-03	>500	9,66 ± 1,57	>500	- -
F056-03	>500	12,39 ± 0,6	>500	11,84 ± 2,66
F011-04	>500	15,85 ± 0,73	>500	25,86 ± 1,86
F034-04	>500	7,42 ± 1,63	>500	10,23 ± 0,87
F051-04	>500	23,18 ± 2,8	>500	25,63 ± 2,16
galantamin	2,59 ± 0,15	- -	58,02 ± 2,34	- -
huperzin A	0,061 ± 0,01	- -	> 500	- -

6. Diskuze

Cílem této rigorózní práce bylo detekovat druhy hub, které vykazují výraznou antioxidační aktivitu a zjistit její možnou souvislost s obsahem fenolických látek. Dále pak zjištění taxonů hub vykazující inhibiční aktivitu vůči erytrocytární AChE a sérové BuChE. Jelikož jsou většinou s inhibiční aktivitou spojeny alkaloidy, byla provedena detekce na přítomnost těchto látek s využitím TLC. Tato práce je součástí fytochemického výzkumu vyšších hub probíhajícího na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie v Hradci Králové.

Testovaným materiálem v této rigorózní práci byly ethanolové extrakty získané z plodnic vyšších hub. Tyto extrakty byly připraveny již dříve v rámci diplomových prací na Katedře botaniky a ekologie. Postup přípravy viz Kapitola 4.

K vyhodnocení ethanolových extraktů hub byla provedena tenkovrstvá chromatografie, která probíhala vzestupným způsobem v předem nasycených komorách. Nejprve byl použit adsorbent oxid hlinitý 60 F_{254} s vyvíjecí soustavou toluen + chloroform + ethanol + diethylamin (70 + 20 + 10 + 4 ml). Jelikož všechny vzorky zůstaly na startu, byla použita jiná soustava o složení toluen + aceton + ethanol + hydroxid amonný (40 + 40 + 6 + 2 ml) za použití silikagelu 60 F_{254} jako adsorbentu (použit i v dalších detekcích jako adsorbent). Po nanesení Dragendorffova činidla došlo k pozitivní reakci na startu u vzorků *Dermocybe semisanguinea* a *Inocybe fraudans*. V domnění, že by se mohlo jednat o tripeptid (více polárních skupin) byla použita ještě polárnější vyvíjecí soustava o složení chloroform + ethanol + diethylamin (80 + 12,5 + 7,5 ml). Ani tato soustava nebyla vyhovující a poslední použitou soustavou se tak stala směs aceton + diethylamin (90 + 10). Bohužel ani v tomto případě nedošlo k pozitivní reakci (nejedná se ani o kvarterní amoniové alkaloidy).

Ani u jednoho z testovaných extraktů hub nedošlo ke zjištění přítomnosti alkaloidů (Tab. 5), ačkoliv výběr testovaných vzorků byl založen na předpokladu jejich možného výskytu. V posledních letech totiž byly alkaloidy prokázány u některých příbuzných rodů (typicky Cortinarius sp.) a druhů (např. *Agrocybe cylindracea*, *Inocybe aeruginascens*, *Mycena sanguinolenta*) v práci testovaných vzorků hub. U rodu Cortinarius sp. byly v minulosti zjištěny alkaloidy s významnou

aktivitou vůči AChE. Konkrétně se jednalo o druh *C. infractus* s obsahem alkaloidu infractopicrinu [34] a druh *C. brunneus* s obsahovou látkou brunnein A [32]. Bohužel ani tuto biologickou aktivitu se v této práci nepodařilo prokázat, i když testované druhy byly příbuzné rodu Cortinarius.

Pro stanovení inhibiční aktivity vůči erytrocytární AChE a sérové BuChE byla použita Ellmanova spektrofotometrická metoda s použitím 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoové kyseliny (DTNB) modifikovaná podle [110]. Metoda je založena na štěpení esteru thiocholinu cholinesterasami na thiocholin a příslušnou kyselinu. Stanovuje se SH- skupina thiocholinu, která se naváže na DTNB, za vzniku žlutě zbarveného produktu. Výsledný produkt se stanovuje spektrofotometricky.

Nejvyšší procentuální pokles nárůstu absorbance, a tím nejvyšší inhibiční aktivitu vůči erytrocytární AChE, ze všech testovaných extraktů vykazoval vzorek *Mycena galericulata* s hodnotou 51,85 ± 0, odečtená hodnota IC_{50} činila 487,3 μg/ml. Nejvyšší aktivitu vůči sérové BuChE vykazoval vzorek *Gymnopilus sapineus* s hodnotami 33,94 ± 0,92 (procentuální pokles nárůstu absorbance), IC_{50} > 500 μg/ml. V porovnání s hodnotami IC_{50} známých inhibitorů cholinesteras galantaminem a huperzinem A (galantamin: IC_{50} HuAChE = 2,59 ± 0,15 μg/ml, IC_{50} HuBuChE = 58,02 ± 2,34 μg/ml, huperzin A: IC_{50} HuAChE = 0,061 ± 0,01 μg/ml, IC_{50} HuBuChE > 500 μg/ml), je inhibiční aktivita obou zmiňovaných vzorků zanedbatelná. To potvrzuje i srovnání s dříve detekovaným alkaloidem infractopicrinem z *C. infractus*, jehož inhibiční aktivita vůči AChE dle [34] je IC_{50} AChE = 9,72 ± 0,19 μg/ml.

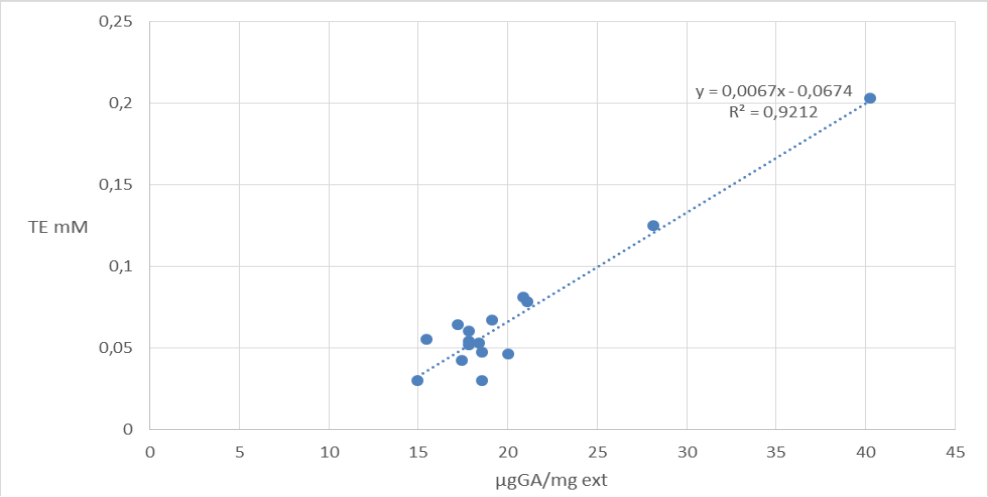
Z existujícího předpokladu, že množství fenolických látek může zodpovídat za antioxidační aktivitu, byl stanoven celkový obsah těchto látek v houbových extraktech za pomocí Folin-Ciocalteu metody. Ze všech testovaných extraktů obsahoval nejvyšší množství fenolických látek vzorek *Inocybe fraudans* (40,28 ± 3,73 μgGA/mg ext.), druhý byl vzorek *Dermocybe semisanguinea* (28,18 ± 3,69 μgGA/mg ext.). Během posledních let bylo u rodů, ze kterých vycházely testované druhy, zjištěn významný obsah fenolických látek (např. [40], [47]). Například i v případě testovaného vzorku *Dermocybe semisanguinea*, ve které bylo izolováno několik druhů antrachinonů – emodin, dermoglaucim, dermocybin, endokrocin, dermolutein a dermorubin [45]. Nicméně i přes tento fakt nebyl u testovaného vzorku

tohoto konkrétního druhu prokázán signifikantní obsah fenolických látek. Výčet dalších pro tuto práci zjištěných druhů, u nichž byly prokázány fenolické látky, je uveden v Tab. 1. Pro úplnost byly testovány všechny vzorky s předpokladem, že by mohlo dojít k nalezení látky s výraznou antioxidační aktivitou. Dříve zjištěné antioxidačně aktivní látky jsou uvedeny v kapitole 3.2.7.

Pro stanovení antioxidační aktivity byl použit ABTS test s využitím SIA. Metoda je založena na odbarvení zelenomodrého $ABTS^{\cdot+}$ radikálu antioxidantem. Výsledný produkt se stanovuje spektrofotometricky. Sekvenční injekční analýza je vhodná pro testování velkých sérii lyofilizovaných extraktů. Výhodou této analýzy je rychlost a vysoká citlivost.

Nejvyšší antioxidační aktivitu vykazoval extrakt *Inocybe fraudans* (TE mM = 0,203), druhým nejaktivnějším vzorkem byl *Dermocybe semisanguinea* (TE mM = 0,125). V porovnání se standardem kyselinou askorbovou (TE mM = 4,999) se jedná o zanedbatelné hodnoty. Testované extrakty hub tak nejsou vhodným zdrojem antioxidačních látek.

Během testování byla zaznamenána závislost antioxidační aktivity na množství fenolických látek (*Inocybe fraudans* a *Dermocybe semisanguinea* jsou druhy s nejvyšším obsahem fenolických látek a současně s nejvyšší antioxidační aktivitou v rámci testovaných vzorků), což je znázorněno na Obr. 21.



Obr. 21: Závislost antioxidační aktivity s množstvím fenolických látek v testovaných vzorcích.

7. Závěr

Cílem této rigorózní práce bylo stanovení celkového množství fenolických látek v houbových extraktech s využitím Folin-Ciocalteu činidla. Dalším cílem bylo kvantifikovat antioxidační aktivitu vodně-ethanolových extraktů hub pomocí testu založeného na redukci (odbarvení) $ABTS^{\cdot+}$ radikálu antioxidantem s využitím sekvenční injekční analýzy (SIA). Dále pak si tato práce kladla za cíl zjištění přítomnosti alkaloidů v extraktech hub pomocí tenkovrstvé chromatografie a v neposlední řadě se jednalo o kvantifikaci inhibiční aktivity vodně-ethanolových houbových extraktů vůči erytrocytární AChE a sérové BuChE s využitím Ellmanovy spektrofotometrické metody.

Pro naplnění cílů bylo použito celkem 15 různých druhů houbových extraktů z čeledi Bolbitaceae, Cortinariaceae a Tricholomataceae. Během testování byla zaznamenána závislost antioxidační aktivity na množství fenolických látek. *Inocybe fraudans* a *Dermocybe semisanguinea* byly druhy s nejvyšším obsahem fenolických látek a současně s nejvyšší antioxidační aktivitou v rámci testovaných vzorků. V porovnání s antioxidační aktivitou standardu (kyselina askorbová) se však jednalo o zanedbatelné hodnoty, tudíž nelze testované druhy hub považovat za významné zdroje antioxidačních látek. Co se týče stanovení přítomnosti alkaloidů pomocí TLC, nebyly tyto látky dekovány u žádného z testovaných vzorků. Ani následné stanovení cholinesterasové inhibiční aktivity nepřineslo objev významného zdroje aktivní substance inhibující erytrocytární AChE a sérové BuChE, jenž by mohla přispět k léčbě Alzheimerovy choroby. Ze všech testovaných druhů vykazoval nejvyšší inhibiční aktivitu vůči erytrocytární AChE extrakt *Mycena galericulata*, vůči sérové BuChE se jednalo o druh *Gymnopilus sapineus*. V porovnání s hodnotami standartních inhibitorů cholinesteras (galantaminem a huperzinem A) se však jednalo o zanedbatelné hodnoty.

8. Literatura

[1] Klán, J. (1989). Co víme o houbách. Praha: SPN, 310 s.

[2] Bielli, E. (2001). Houby: obsáhlý rádce pro určování a sběr hub. J. Váňa. Praha: Euromedia Group - Ikar, 224 s.

[3] Keizer, G. J. (2005). Houby: Encyklopedie. L. Hauzerová. 2. vyd. Praha: Rebo, 288 s.

[4] Semerdžieva, M. & Veselský, J. (1986). Léčivé houby dříve a nyní. 1. vyd. Praha. 180 s.

[5] Váňa, J. (1996). Systém a vývoj hub a houbových organismů. Praha: Karolinum, 164 s.

[6] Svrček, M. (1996). Houby. Praha : Aventinum, 279 s.

[7] Jablonský, I. & Šašek, V. (2006). Jedlé a léčivé houby: pěstování a využití. Praha: Brázda, 263 s.

[8] Hrouda, P. (2015). Obecná mykologie, [cit. 2017-02-22]. Dostupné z WWW: <http://www.sci.muni.cz/botany/mycology/mykolog.htm>

[9] Kalač, P. (2008). Houby: víme, co jíme? České Budějovice: Dona, 114 s.

[10] Racek, J. (2003). Oxidační stres: a možnosti jeho ovlivnění. Praha: Galén, 89 s.

[11] Holeček, V. & Rokyta, R. (2005). Volně radikálová teorie stárnutí. *Ces Ger Rev 3*(1), 27–33.

[12] Læssøe, T. & Del Conte, A. (1996). Houby, Fortuna Print, 256 s.

[13] Opletal, L. & Koula, V. (2017). *Daidalea : Houby* [online]. [cit. 2017-02-20]. Dostupné z WWW: <http://apps.faf.cuni.cz/daidalea/>.

[14] Evans, S. & Kibby, G. (2007). Houby: nový kapesní atlas. V Praze: Slovart, 296 s.

[15] Hagara, L. (2015). Ottova encyklopedie hub. 1. české vyd. Praha: Ottovo nakladatelství, 1152 s.

[16] Zicha, O., Hrb, J., Maňas, M. & Novák, J. (2017). *BioLib : Biological Library* [online]. [cit. 2017-02-20]. Dostupné z WWW: <http://www.biolib.cz/>

[17] Antonín, V. (2006). Encyklopedie hub a lišejníků. Praha: Libri: Academia, 471 s.

[18] Hagara, L., Antonín, V. & Baier, J. (2010). Velký atlas hub. Praha: Ottovo Nakladatelství, 432 s.

[19] Kothe, H. W. (2012). Houby: určování, sběr. Vyd. 2., (upr.). Praha: Knižní klub, 256 s.

[20] Hagara, L. (1993). Atlas hub. Martin: Neografia, 461 s.

[21] Kovář, L. (1999). Brevíř o houbách. Praha: Olympia, 154 s.

[22] Valíček, P. (2011). Houby a jejich léčivé účinky. 1. vyd. Benešov: Start. 151 s.

[23] Vaskovsky, V. E., Khotimchenko, S. V., & Boolugh, E. M. (1998). Distribution of diacylglycerotrimethylhomoserine and phosphatidylcholine in mushrooms. *Phytochemistry, 47*(5), 755-760.

[24] Luan, R., Liang, Y., Chen, Y., Liu, H., Jiang, S., Che, T., ... & Sun, H. (2010). Opposing developmental functions of *Agrocybe aegerita* galectin (AAL) during mycelia differentiation. *Fungal biology*, *114*(8), 599-608.

[25] Koshino, H., Lee, I. K., Kim, J. P., Kim, W. G., Uzawa, J., & Yoo, I. D. (1996). Agrocybenine, novel class alkaloid from the Korean mushroom *Agrocybe cylindracea*. *Tetrahedron letters*, *37*(26), 4549-4550.

[26] Zhang, Y., Yu, S., Zhang, P., Zhang, L. & Fan, M. (2011). Analysis of volatile components of *Flammulina velutipes* and *Agrocybe chaxingu*, *Shipin Yu Fajiao Gongye*, *37*(7), 188-192.

[27] Fushimi, K., Anzai, K., Tokuyama, S., Kiriiwa, Y., Matsumoto, N., Sekiya, A., … & Kawagishi, H. (2012). Agrocybynes A–E from the culture broth of *Agrocybe praecox*. *Tetrahedron*, *68*(4), 1262-1265.

[28] Liu, L. Y., Zhang, L., Feng, T., Li, Z. H., Dong, Z. J., Li, X. Y., ... & Liu, J. K. (2011). Unusual illudin-type sesquiterpenoids from cultures of *Agrocybe salicacola*. *Natural products and bioprospecting*, *1*(2), 87-92.

[29] Zhu, Y. C., Wang, G., Yang, X. L., Luo, D. Q., Zhu, Q. C., Peng, T., & Liu, J. K. (2010). Agrocybone, a novel bis-sesquiterpene with a spirodienone structure from basidiomycete *Agrocybe salicacola*. *Tetrahedron Letters*, *51*(26), 3443-3445.

[30] Beattie, K. D., Rouf, R., Gander, L., May, T. W., Ratkowsky, D., Donner, C. D., ... & Tiralongo, E. (2010). Antibacterial metabolites from Australian macrofungi from the genus *Cortinarius*. *Phytochemistry*, *71*(8), 948-955.

[31] Hrdina, V., Hrdina, R., Jahodář, L., Martinec, Z. & Měrka, v. (2004). Přírodní toxiny a jedy. Praha: Galén, 302 s.

[32] Teichert, A., Schmidt, J., Porzel, A., Arnold, N., & Wessjohann, L. (2007). Brunneins A–C, β-carboline alkaloids from *Cortinarius brunneus*. *Journal of natural products*, *70*(9), 1529-1531.

[33] Arnold, N., Palfner, G., Kuhnt, C., & Schmidt, J. (2016). Chemistry of the earthy odour of basidiomata of *Cortinarius hinnuleus* (Basidiomycota, Agaricales). *Austrian J. Mycol*. *25*, 6 p.

[34] Geissler, T., Brandt, W., Porzel, A., Schlenzig, D., Kehlen, A., Wessjohann, L., & Arnold, N. (2010). Acetylcholinesterase inhibitors from the toadstool *Cortinarius infractus*. *Bioorganic & medicinal chemistry*, *18*(6), 2173-2177.

[35] Liu, J. K. (2007). Secondary metabolites from higher fungi in China and their biological activity. *Drug Discov Ther*, *1*(2), 94-103.

[36] Gill, M., & Morgan, P. M. (1999). New xanthorin glycosides from a *Dermocybe* Species 1. *Journal of natural products*, *62*(9), 1298-1300.

[37] Gill, M., Qureshi, A., & Watling, R. (1992). Pigments of fungi, part 27. New xanthorin derivatives from a fungus of the genus *Dermocybe*. *Journal of Natural Products*, *55*(4), 517-520.

[38] Keller, G., & Ammirati, J. F. (1995). Chemotaxonomic studies on the pigmentation of North American species of *Dermocybe (Fr.) Wünsche, section Dermocybe and related species*. Beih. Sydowia X: 127-136.

[39] Gill, M., & Morgan, P. M. (2001). New fungal anthraquinones. *Arkivoc*, *7*, 145-156.

[40] Beattie, K., Elsworth, C., Gill, M., Milanovic, N. M., Prima-Putra, D., & Raudies, E. (2004). Austrocolorins A 1 and B 1: atropisomeric 10, 10′-linked dihydroanthracenones from an Australian *Dermocybe* sp. *Phytochemistry*, *65*(8), 1033-1038.

[41] Gill, M., & Elsworth, C. (2000). 1, 3-Dimethylpyranonaphthoquinone biosynthesis in the fungus *Dermocybe cardinalis*. *Natural Product Letters*, *14*(6), 411-416.

[42] Horak, E. (1987). New species of *Dermocybe* (Agaricales) from New Zealand. *Sydowia*, *40*, 81-112.

[43] Antonowitz, A., Gill, M., Morgan, P. M., & Jin, Y. U. (1994). Coupled anthraquinones from the toadstool *Dermocybe icterinoides*. *Phytochemistry, 37*(6), 1679-1683.

[44] Tóth, Z. A., Raatikainen, O., Naaranlahti, T., & Auriola, S. (1993). Isolation and determination of alizarin in cell cultures of *Rubia tinctorum* and emodin in *Dermocybe sanguinea* using solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, *630*(1-2), 423-428.

[45] Steglich, W., Arnold, R., Lösel, W., & Reininger, W. (1972). Biosynthesis of anthraquinone pigments in *Dermocybe*. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, *(2)*, 102-103.

[46] Elsworth, C., Gill, M., & Saubern, S. (2000). Biosynthesis of tetrahydroanthraquinones in fungi. *Phytochemistry*, *55*(1), 23-27.

[47] Gill, M., & Smrdel, A. F. (2000). Pigments of fungi. LXV. Tetrahydroanthraquinone and anthraquinone gentiobiosides from the fungus *Dermocybe splendida*. *Australian Journal of Chemistry*, *53*(1), 47-58.

[48] Lee, I. K., Cho, S. M., Seok, S. J., & Yun, B. S. (2008). Chemical constituents of *Gymnopilus spectabilis* and their antioxidant activity. *Mycobiology*, *36*(1), 55-59.

[49] Aqueveque, P., Becerra, J., Palfner, G., Silva, M., Alarcon, J., Anke, T., & Sterner, O. (2006). Antimicrobial activity of metabolites from mycelial cultures of chilean basidiomycetes. *Journal of the Chilean Chemical Society*, *51*(4), 1057-1060.

[50] Nunez-Alarcon, J., PAREDES, J. C., Carmona, M. T., & Quinones, M. (2001). Ostopanic acid, a cytotoxic fatty acid from *Gymnopilus spectabilis*. *Boletín de la Sociedad Chilena de Química*, *46*(2), 227-229.

[51] Takano, S., Sugihara, T., & Ogasawara, K. (1991). The first enantiocontrolled synthesis of (3S, 8S)-(-)-4, 6-decadiyne-1, 3, 8-triol isolated from a toxic mushroom *Gymnopilus spectabilis*. *Tetrahedron letters*, *32*(24), 2797-2798.

[52] Kusano, G., Koike, Y., Inoue, H., Nozoe, S. (1986). The constituents of *Gymnopilus spectabilis*. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, *34*(8), 3465-3470.

[53] Nozoe, S., Koike, Y., Ito, N., & Kusano, G. (1984). Isolation and structure of gymnoprenol-D, a homologous series of fully hydrated polyisoprenepolyol from *Gymnopilus spectabilis*. *Chemistry letters*, *13*(6), 1001-1002.

[54] Gartz, J. (1990). Manufacture of tryptophan derivatives with higher fungi, patent DD 278600

[55] Jensen, N., Gartz, J., & Laatsch, H. (2006). Aeruginascin, a trimethylammonium analogue of psilocybin from the hallucinogenic mushroom *Inocybe aeruginascens*. *Planta medica*, *72*(07), 665-666.

[56] Bekker, A. M., Gurevich, L. S., Nezdoiminogo, E. L., Onoprienko, B. B. & Koz'min, Yu. P. (1989). A chromatographic study of some indole metabolites in the genus *Inocybe* (Basidiomycetes). *Mikologiya i Fitopatologiya, 23*(2), 129-34.

[57] Gartz, J. (1989). Analysis of aeruginascin in fruit bodies of the mushroom *Inocybe aeruginascens*. *International Journal of Crude Drug Research*, *27*(3), 141-144.

[58] Endo, S., Mitsuhashi, T., Enomoto, T., Yonezawa, H., Koyatsu, T., Katagiri, Y. & Sugiyama, N. (1978). Lipids on some species of Basidomycetes. *Tokyo Gakugei Daigaku Kiyo, Dai-4-bumon: Sugaku, Shizen Kagaku*, *30*, 85-89.

[59] Unger, S. E., Vincze, A., Cooks, R. G., Chrisman, R., & Rothman, L. D. (1981). Identification of quaternary alkaloids in mushroom by chromatography/secondary ion mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, *53*(7), 976-981.

[60] Aqueveque, P., Anke, T., Anke, H., Sterner, O., Becerra, J., & Silva, M. (2005). Favolon B, a new triterpenoid isolated from the chilean *Mycena* sp. strain 96180. *Journal of Antibiotics*, *58*(1), 61.

[61] Swarts, H. J., Teunissen, P. J., Verhagen, F. J., Field, J. A., & Wijnberg, J. B. (1997). Chlorinated anisyl metabolites produced by basidiomycetes. *Mycological Research*, *101*(3), 372-374.

[62] Kleinwaechter, P., Schlegel, B., Dornberger, K., & Doerfelt, H. (1999). 9-Hydroxyoudemansin A, a novel antifungal (E)- BETA-methoxyacrylate from a *Mycena* species. *The Journal of antibiotics*, *52*(3), 332-334.

[63] Peters, S., & Spiteller, P. (2006). Chloro-and bromophenols from cultures of *Mycena alcalina*. *Journal of natural products*, *69*(12), 1809-1812.

[64] Jaeger, R. J., & Spiteller, P. (2010). Mycenaaurin A, an antibacterial polyene pigment from the fruiting bodies of *Mycena aurantiomarginata*. *Journal of natural products*, *73*(8), 1350-1354.

[65] Buchanan, M. S., Steglich, W., & Anke, T. (1999). Strobilurin N and two metabolites related to chorismic acid from the fruit bodies of *Mycena crocata* (Agaricales). *Zeitschrift für Naturforschung C*, *54*(7-8), 463-468.

[66] Chen, X., Yang, J. & Guo, S. (2000). Sterol constituents of *Mycenae dendrobii*. *Yaoxue Xuebao*, *35*(5), 367-369.

[67] Hosokawa, N., Momose, I., Sekizawa, R., Naganawa, H., Iinuma, H., Takeuchi, T., & Matsui, S. (2000). New strobilurins O and P from a mushroom. *The Journal of antibiotics*, *53*(3), 297-300.

[68] Wijnberg, J. B., Van Veldhuizen, A., Swarts, H. J., Frankland, J. C., & Field, J. A. (1999). Novel monochlorinated metabolites with a 1-benzoxepin skeleton from Mycena galopus. *Tetrahedron letters*, *40*(31), 5767-5770.

[69] Peters, S., Jaeger, R. J., & Spiteller, P. (2008). Red pyrroloquinoline alkaloids from the mushroom *Mycena haematopus*. *European Journal of Organic Chemistry*, *2008*(2), 319-323.

[70] Harttig, U., Anke, T., Scherer, A., & Steglich, W. (1990). Leaianafulvene, a sesquiterpenoid fulvene derivative from cultures of *Mycena leaiana*. *Phytochemistry*, *29*(12), 3942-3944.

[71] Becker, U., Erkel, G., Anke, T., & Sterner, O. (1997). Puraquinonic acid, a novel inducer of differentiation of human HL-60 promyelocytic leukemia cells from *Mycena pura* (Pers. ex Fr.). *Natural Product Letters*, *9*(3), 229-236.

[72] Ogishi, H. (1975). Glutamic acid derivatives. *Japan Kokai 75*, *149*(4).

[73] Hatanaka, S., Niimura, Y., Taniguchi, K., Kinoshita, F. & Katayama, H. (1976). Specific amino acids in some edible mushrooms. *Mushroom Science*, *9*(1), 809-813.

[74] Peters, S., & Spiteller, P. (2007). Sanguinones A and B, blue pyrroloquinoline alkaloids from the fruiting bodies of the mushroom *Mycena sanguinolenta*. *Journal of natural products*, *70*(8), 1274-1277.

[75] Jente, R., Bosold, F., Bäuerle, J., & Anke, T. (1985). Tetra-acetylenic metabolites from *Mycena viridimarginata*. *Phytochemistry*, *24*(3), 553-559.

[76] Engler, M., Anke, T., & Sterner, O. (1998). Tintinnadiol, a sphaeroane diterpene from fruiting bodies of *Mycena tintinnabulum*. *Phytochemistry*, *49*(8), 2591-2593.

[77] Piraino, F. F. (2005). The development of the antiviral drug RC 28 from *Rozites caperata* (Pers.: Fr.) P. Karst.(Agaricomycetideae). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, *7(3)*.

[78] Piraino, F., & Brandt, C. R. (1999). Isolation and partial characterization of an antiviral, RC-183, from the edible mushroom *Rozites caperata*. *Antiviral research*, *43(2)*, 67-78.

[79] Stumpf, W. (2016). Secondary plant products: a comprehensive treatise (Vol. 7). E. E. Conn (Ed.). Academic Press.

[80] Matsumoto, N. (1984). Isolation and identification of S-2-aminoethyl-L-systeine from *Rozites caperta* and 2-amino-3-butenoic acid from *Rhodophyllus crassipes* and their antibacterial activity. *Toho Igakkai Zasshi*, *31*, 249-64.

[81] Kovář, L. (2010). Praktický houbař. 1. vyd. Praha: Dokořán, 174 s.

[82] Al-Fatimi, M., Schröder, G., Kreisel, H., & Lindequist, U. (2013). Biological activities of selected basidiomycetes from Yemen. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, *68*(3), 221-226.

[83] Petrović, J., Glamočlija, J., Stojković, D., Nikolić, M., Ćirić, A., Fernandes, A., ... & Soković, M. (2014). Bioactive composition, antimicrobial activities and the influence of *Agrocybe aegerita* (Brig.) Sing on certain quorum-sensing-regulated functions and biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Food & function*, *5(12),* 3296-3303.

[84] Lee, B. R., Kim, S. Y., Kim, D. W., An, J. J., Song, H. Y., Yoo, K. Y., ... & Joo, J. H. (2009). *Agrocybe chaxingu* polysaccharide prevent inflammation through the inhibition of COX-2 and NO production. *BMB reports*, *42*(12), 794-799.

[85] Zhao, C., Sun, H., Tong, X. and Qi, Y. (2003) Anantitumourlectin from the edible mushroom *Agrocybe aegerita*. *Biochemical Journal*, *374*, 321-327.

[86] Rosa, L. H., Souza-Fagundes, E. M., Machado, K. M., Alves, T. M., Martins-Filho, O. A., Romanha, A. J., ... & Zani, C. L. (2006). Cytotoxic, immunosuppressive and trypanocidal activities of agrocybin, a polyacetylene produced by *Agrocybe perfecta* (Basidiomycota). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *22(6)*, 539-545.

[87] Liu, M., Jing, H., Zhang, J., Che, G., Zhou, M., Gao, Z., ... & Jia, L. (2016). Optimization of mycelia selenium polysaccharide extraction from *Agrocybe*

cylindracea SL-02 and assessment of their antioxidant and anti-ageing activities. *PloS one*, *11*(8), e0160799.

[88] Zhao, J. K., Wang, H. X., & Ng, T. B. (2009). Purification and characterization of a novel lectin from the toxic wild mushroom *Inocybe umbrinella. Toxicon*, *53*(3), 360-366.

[89] Reinoso, R., Cajas-Madriaga, D., Martinez, M., San Martin, A., Perez, C., Fajardo, V., & Becerra, J. (2013). Biological activity of macromycetes isolated from Chilean subantarctic ecosystems. *Journal of the Chilean Chemical Society, 58(4)*, 2016-2019.

[90] Hautzel, R., Anke, H., & Sheldrick, W. S. (1990). Mycenon, a new metabolite from a *Mycena* species TA 87202 (basidiomycetes) as an inhibitor of isocitrate lyase. *The Journal of Antibiotics*, *43*(10), 1240-1244.

[91] Anke, T. (1995). The antifungal strobilurins and their possible ecological role. *Canadian journal of botany*, *73*(S1), 940-945.

[92] Daferner, M., Anke, T., Hellwig, V., Steglich, W., & Sterner, O. (1998). Strobilurin M, tetrachloropyrocatechol and tetrachloropyrocatechol methyl ether: new antibiotics from a *Mycena* species. *The Journal of antibiotics, 51*(9), 816-822.

[93] Gong, M., Piraino, F., Yan, N., Zhang, J., Xia, M., Ma, J., ... & Liu, X. (2009). Purification, partial characterization and molecular cloning of the novel antiviral protein RC28. Peptides, 30(4), 654-659.

[94] Pláteník, J. (2009). Volné radikály, antioxidanty a stárnutí. Interní medicína pro praxi, 11(1), 30-33.

[95] Mandelker, L. (2009). Oxidační stres: role mitochondrií, volných radikálů a antioxidantů. Praha: Pierot, 220 s.

[96] Štípek, S., Borovanský, J. & Čejková, J. (2000). Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a nemoci. 1. vyd. Praha: Grada, 320 s.

[97] Ortembergová, A. (2003). Mládneme s antioxidanty. Vyd. 1. Praha: Ivo Železný, 2003. 126 s.

[98] Koukolík, F. & Jirák, R. (1998). Alzheimerova nemoc a další demence. 1. vyd. Praha: Grada Publishing. 229 s.

[99] Koukolík, F. & Jirák, R. (2004). Demence: neurobiologie, klinický obraz, terapie. 1. vyd. Praha: Galén. 335 s.

[100] Ambler, Z. et al. (2010). Klinická neurologie. Vyd. 1. Praha: Triton.

[101] Růžička, E. et al. (2003). Diferenciální diagnostika a léčba demencí: příručka pro praxi. 1. vyd. Praha: Galén. 175 s.

[102] Sevigny, J., Chiao, P., Bussière, T., Weinreb, P. H., Williams, L., Maier, M., ... & O'Gorman, J. (2016). The antibody aducanumab reduces Aβ plaques in Alzheimer's disease. *Nature*, *537(7618)*, 50-56.

[103] Novak, P., Schmidt, R., Kontsekova, E., Zilka, N., Kovacech, B., Skrabana, R., ... & Parrak, V. (2016). Safety and immunogenicity of the tau vaccine AADvac1 in patients with Alzheimer's disease: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1 trial. *The Lancet Neurology*.

[104] Hort, J. & Jirák, R. (2007). Alzheimerova choroba a jiné demence, aneb, Co v učebnicích 20. století nebylo. Vyd. 1. Praha: MediMedia Information, 29 s.

[105] Stahl, E. (1969). Thin-layer chromatography, A laboratory handbook. Springer Berlin, Berlin-Heidelberg-New York, 1065 s.

[106] Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine, 26(9)*, 1231-1237.

[107] Polášek, M., Skála, P., Opletal, L. & Jahodář, L. (2004). Rapid automated assay of anti-oxidation/radical-scavenging activity of natural substances by sequential injection technique (SIA) using pectrophotometric detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry. 379, 754-758*.

[108] Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, *16(3)*, 144-158.

[109] Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., & Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical pharmacology*, *7*(2), 8895.

[110] Bajgar, J. (1972). Stanovení aktivity cholinesterázy v lidské krvi – možná modifikace pro polní použití. Voj. zdrav. listy, 78-80.

[111] Steck, T. L., & Kant, J. A. (1973). Preparation of impermeable ghosts and inside-out vesicles from human erythrocyte membranes. *Methods in enzymology*, *31*, 172-180

9. Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra	Katedra farmaceutické botaniky a ekologie
Kandidát	Mgr. Lenka Pásztó
Konzultant	Ing. Kateřina Macáková Ph.D.
Název rigorózní práce	Biologická aktivita makromycet – D

Klíčová slova: houby, cholinesterasová inhibiční aktivita, fenolické látky, alkaloidy, Alzheimezova nemoc, antioxidační aktivita.

V rámci této rigorózní práce bylo zpracováno 15 taxonů hub z čeledi Bolbitaceae, Cortinariaceae a Tricholomataceae. U všech houbových extraktů byla provedena detekce na přítomnost alkaloidů s využitím tenkovrstvé chromatografie. Obsah alkaloidů nebyl detekován u žádného z testovaných druhů hub.

Všechny houbové extrakty byly podrobeny stanovení cholinesterasové inhibiční aktivity pomocí Ellmanovy spektrofotometrické metody za použití 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoové kyseliny (DTNB). Ze všech testovaných druhů vykazoval nejvyšší inhibiční aktivitu vůči erytrocytární AChE extrakt *Mycena galericulata*, vůči sérové BuChE se jednalo o druh *Gymnopilus sapineus*. V porovnání s hodnotami standartních inhibitorů cholinesteras galantaminem a huperzinem A, je inhibiční aktivita obou vzorků zanedbatelná.

Pro zjištění množství fenolických látek byla použita Folin-Ciocalteu metoda. Ze vzorků testovaných v této práci obsahoval nejvyšší množství fenolických látek vzorek *Inocybe fraudans*. Dále byla stanovena antioxidační aktivita ABTS (2,2´-azinobis (3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina)) testem s využitím sekvenční injekční analýzy (SIA). Nejvyšší aktivitu vykazoval extrakt *Inocybe fraudans*.

10. Abstract

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department	Department of Pharmaceutical Botany and Ecology
Candidate	Mgr. Lenka Pásztó
Consultant	Ing. Kateřina Macáková Ph.D.
Title of Thesis	Biological activity of macromycetes – D

Keywords: fungi, cholinesterase inhibition activity, phenolic compounds, alkaloids, Alzheimer disease, antioxidant activity.

In this thesis, altogether 15 fungal species from the families Bolbitaceae, Cortinariaceae a Tricholomataceae were tested for their biological activities. The extracts of all species were assessed for the alkaloid content with the use of thin-layer chromatography (TLC). Significant content of alkaloid substances was not detected in any of the tested mushroom species.

All fungal extracts were also tested for their cholinesterases inhibition activity using Ellman's spectrophotometric method with 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid. The highest inhibition activity against erythrocyte AChE was indicated in the case of *Mycena galericulata* extract, and against serum BuChE in the case of *Gymnopilus sapineus*. Nevertheless, in comparison with values of standard inhibitors (galanthamine and huperzine A), the inhibition activity of both extracts was negligible.

Finally, Folin-Ciocalteu's method was applied to set an amount of phenolic compounds in tested extract samples. From the results, the highest amount of phenolic compounds was detected in *Inocybe fraudans* fungus extract. Furthermore, antioxidant activity was assessed by ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)) test with the use of sequential injection analysis (SIA). It enabled to observe the highest activity in the case of *Inocybe fraundans*.